



Hydrogénases artificielles: Nouveaux catalyseurs bio-synthétiques pour la production d'hydrogène

Marine Bacchi

► To cite this version:

Marine Bacchi. Hydrogénases artificielles: Nouveaux catalyseurs bio-synthétiques pour la production d'hydrogène. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT: . tel-00944978

HAL Id: tel-00944978

<https://theses.hal.science/tel-00944978>

Submitted on 11 Feb 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Chimie inorganique et bio-inorganique**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Marine BACCHI

Thèse dirigée par **Vincent ARTERO**

préparée au sein du **Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux**

dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

Hydrogénases artificielles :

Nouveaux catalyseurs biosynthétiques pour la production d'hydrogène

Soutenue le 24 septembre 2013,
devant le jury composé de :

Mme. Michèle SALMAIN, Rapporteur
M. Jean-Pierre MAHY, Rapporteur
Mme. Catherine BELLE, Présidente
M. Marc FONTECAVE, Examineur
M. Marius REGLIER, Examineur
M. Vincent ARTERO, Directeur de thèse



A Cyril et Andrea
A mes parents et Pierre
A mes grands parents

Table des matières

Remerciements	6
Introduction générale	9
 CHAPITRE I	
Bibliographie.....	13
1. Les hydrogénases.....	15
1.1. Présentation	15
1.2. Classification.....	17
1.2.1. Les hydrogénases FeFe.....	17
1.2.2. Les hydrogénases Hmd.....	18
1.2.3. Les hydrogénases NiFe et NiFeSe	19
1.3. Sensibilité à l'oxygène	22
1.4. Activité enzymatique et électrochimie	24
1.5. Applications technologiques	25
2. Chimie bio-inspirée et chimie biomimétique	25
2.1. De l'étude des sites actifs à de nouveaux catalyseurs	25
2.2. Etude catalytique	26
2.3. Modèles du site actif des hydrogénases	28
2.3.1. Analogues synthétiques du site actif des hydrogénases FeFe.....	28
2.3.1.1. Les structures	28
2.3.2. Analogues synthétiques du site actif des hydrogénases NiFe.....	32
2.3.3. Des modèles biomimétiques aux modèles bio-inspirés	36
2.4. Des modèles du site actif de la vitamine B12 : les cobaloximes.....	37
2.4.1. La vitamine B12 s : « super-nucléophile » du monde biologique.....	38
2.4.2. Les cobaloximes	38
2.4.3. Relation structure-activité pour la production d'hydrogène catalysée par les cobaloximes	39
2.4.3.1. Au niveau des potentiels électrochimiques et électrocatalytiques	40
2.4.3.2. Au niveau de la stabilité.....	40
2.4.4. Mécanisme de production d'hydrogène.....	41
3. Chimie biosynthétique	44
3.1. Généralités sur les enzymes artificielles	44

3.2. Les différentes voies de formation d'une enzyme artificielle	46
3.2.1. Par liaisons faibles entre les ligands du complexe inorganique et la protéine	46
3.2.2. Par la coordination de certains acides aminés avec le métal du catalyseur	51
3.2.3. Par liaison non covalente avec un ou des acides aminés de la protéine	53
3.3. Les hydrogénases artificielles	55
3.4. La myoglobine : protéine hôte de choix	58

CHAPITRE II

Catalyseurs et enveloppes protéiques 67

1. Choix du système d'étude 69

1.1. Les catalyseurs utilisés 69

1.1.1. Les cobaloximes 69

1.1.2. Les complexes diimine dioxime de cobalt..... 71

1.1.3. Analogie avec l'hème 72

1.2. Les hémoprotéines..... 72

1.2.1. La myoglobine..... 73

1.2.2. L'hème oxygénases 75

1.2.3. FixL 77

2. Tentatives d'obtention directe de la myoglobine soluble..... 79

2.1. Production de la myoglobine de cachalot sous forme soluble 79

2.2. Les différentes méthodes de purification 82

2.3. Analyse de la protéine obtenue 84

3. Production et purification de l'apo-myoglobine de cachalot fonctionnelle 88

3.1. Production de la myoglobine de cachalot sous forme de corps d'inclusion et purification 88

3.2. Analyse de la protéine obtenue 89

3.3. Reconstitution de l'holo-myoglobine..... 91

CHAPITRE III

Préparation et caractérisation des hybrides..... 95

1. Préparation générale des hybrides 97

1.1. La myoglobine et les complexes de nickel..... 97

1.2. Les complexes de Co(II) 100

1.3. Les complexes de Co(III)..... 102

1.4. Conclusion..... 103

2. Caractérisation des hybrides Mb/HO1-[Co(dmgBF_2)$_2$(H$_2$O)$_2$]	104
2.1. Spectroscopie UV/Visible et quantification du cobalt	104
2.2. Caractérisation de l'état d'agrégation et étude de la stabilité en solution	106
2.2.1. Caractérisation de l'état d'agrégation de l'hybride Mb-[Co(dm gBF_2) $_2$ (H $_2$ O) $_2$]	106
2.2.2. Calcul de la constante de dissociation associée à l'hybride Mb-[Co(dm gBF_2) $_2$ (H $_2$ O) $_2$]	107
2.2.3. Etude de l'insertion de l'hème dans l'hybride Mb-[Co(dm gBF_2) $_2$ (H $_2$ O) $_2$]	109
2.2.4. Etude de l'insertion de l'hème dans l'hybride HO1-[Co(dm gBF_2) $_2$ (H $_2$ O) $_2$]	110
2.2.5. Conclusions	112
2.3. Etude spectroscopique sur l'environnement du complexe	112
2.3.1. Etude de spectroscopie d'absorption aux rayons X	113
2.3.2. Etude de spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)	116
2.3.2.1. Description des spectres et détermination de la sphère de coordination du cobalt	116
2.3.2.2. Etude de saturation du signal et quantification de spin	121
2.3.2.3. Détermination des constantes du signal (g_x , g_y et g_z) et des couplages hyperfin et superhyperfin	123
3. Caractérisation des hybrides Mb/HO1-[Co(dmgH)$_2$(H$_2$O)$_2$]	129
3.1. Spectroscopie UV/Visible et quantification du cobalt	129
3.2. Etude du degré d'oxydation du cobalt dans l'hybride	131
3.3. Etude de la forme en solution des hybrides Mb/HO1-[Co(dm gH) $_2$ (H $_2$ O) $_2$]	133
3.4. Stabilité des hybrides Mb/HO1-[Co(dm gH) $_2$ (H $_2$ O) $_2$]	135
3.4.1. Mb-[Co(dm gH) $_2$ (H $_2$ O) $_2$]	135
3.4.2. HO1-[Co(dm gH) $_2$ (H $_2$ O) $_2$]	137
4. Etude de Mb-[CoDODOHpnCl$_2$]	138
4.1. Spectroscopie UV-Visible	138
4.2. Etude de la stabilité et structures secondaires de l'hybride Mb-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl $_2$]	139
4.3. Etude de la stabilité de l'hybride HO1-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl $_2$]	140
5. Etude de docking	141
6. Spectrométrie de masse en conditions non dénaturantes	146
7. Etude cristallographique	148

CHAPITRE IV

Etudes électrochimiques et catalytiques	151
1. Caractérisation électrochimique	153

1.1. généralités.....	153
1.2. Etude de l'holo-myoglobine, préparation de l'électrode et étude du greffage.....	154
1.3. Etude de l'hybride Mb-[Co(dm \bar{g} BF $_2$) $_2$ (H $_2$ O) $_2$] (MbCoBF $_2$)	157
1.4. Etude de l'hybride Mb-[Co(dm \bar{g} H) $_2$ (H $_2$ O) $_2$] (MbCoH)	161
1.5. Etude de l'hybride Mb-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl $_2$] (MbCoD)	163
1.6. Electrodes gélifiées	167
2. Etude catalytique.....	169
2.1. Généralités.....	169
2.1.1. Méthode d'analyse	169
2.1.2. Thermodynamique et cinétique	170
2.1.3. Les réducteurs chimiques	171
2.1.4. Les couples photosensibilisateur/donneur d'électrons sacrificiel	172
2.2. Résultats	175
2.2.1. Réduction chimique.....	176
2.2.1.1. Réducteur Eu-DTPA à pH 7.....	176
2.2.1.2. Réducteur Eu-EGTA à pH 7	182
2.2.2. Conditions photocatalytiques	185
2.2.2.1. Couple [Ru(bipy) $_3$]Cl $_2$ /ascorbate à pH 6.....	185
2.2.2.2. Couple déazaflavine/Tris à pH 7	187
3. Discussion.....	190
3.1. Relation entre électrochimie et catalyse.....	190
3.2. Influence de la nature du complexe.....	191
3.3. Influence de l'enveloppe protéique	192
4. Conclusion.....	192
Conclusion et Perspectives.....	196
Matériels et Méthodes.....	201
Annexe 1	235
Annexe 2	236
Références bibliographiques	245

Remerciements

Ce travail de thèse a été financé par le CEA et effectué au CEA de Grenoble au sein du Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux.

Ces trois années ont été pour moi très enrichissantes tant scientifiquement que personnellement.

J'aimerais tout d'abord remercier Vincent Artero pour avoir encadré ma thèse. Merci d'avoir partagé avec moi une partie de tes connaissances, merci également pour les réflexions et discussions scientifiques que l'on a pu avoir. A tes côtés j'ai développé de nombreuses connaissances et j'ai pu prendre confiance en moi.

Je tiens à remercier également Marc Fontecave pour m'avoir accueilli dans son laboratoire pour mon stage de Master 2. Cette aventure n'aurait pas commencé si tu n'avais pas accepté de m'accueillir à Grenoble pour travailler sur ce sujet passionnant. Merci également à Stéphane Ménage qui a pris la relève de la direction en conservant le dynamisme et la bonne ambiance du laboratoire.

Je voudrais également remercier Murielle Chavarot-Kerlidou pour son aide tout au long de ces trois années, pour son encadrement en synthèse organique et pour sa présence bienveillante.

Un merci tout particulier à Natty pour avoir partagé avec moi sa paillasse et ses connaissances sur les protéines, pour sa gentillesse, sa bonne humeur et pour tous ces bons moments partagés.

Merci également à Elodie Girgenti qui a partagé avec moi ses connaissances des enzymes artificielles. Ta présence m'a été précieuse à de nombreuses reprises. Je n'oublie pas non plus Gustav Berggren, mon compagnon d'hydrogénases artificielles, sans qui cette thèse ne se serait certainement pas aussi bien passée.

Merci à Nicolas Duraffourg pour toutes ces journées passées à la RPE à m'expliquer comment fonctionne l'appareil et comment manipuler dessus.

Merci à tous mes colocataires de bureau, de passage plus ou moins long, c'était toujours un plaisir !! Une petite pensée plus particulièrement à Nicolas Q. qui a eu le « privilège » de me supporter pendant cette longue période de rédaction et qui s'est si bien occupé de moi.... Tes gâteaux au chocolat minute avec cœur fondant au chocolat blanc resteront dans les annales....

Merci à tous les chimistes et biochimistes du laboratoire pour leur accueil chaleureux. S'il est tellement agréable de venir au labo tous les matins c'est en grande partie grâce à vous tous. J'ai passé 3.5 années merveilleuses et enrichissantes tant scientifiquement que personnellement.

Merci aussi à Nathalie pour tout ce qu'elle fait et apporte au laboratoire et à toutes les personnes croisées au détour d'un couloir ou lors des séminaires et des congrès qui ont fait de ces 3.5 années, par leur gentillesse et leur accessibilité, une belle expérience scientifique et humaine.

Un merci tout particulier à Jennifer et Phanélie pour tout ce qu'on a pu partager et qui ne peut pas vraiment s'écrire....

Je finirai par remercier ma famille et plus particulièrement mes parents pour m'avoir toujours soutenue, épaulée, aidée, supportée....La famille en or c'est nous !

Et enfin merci à toi Cyril ...

INTRODUCTION

GENERALE

Introduction générale

L'épuisement des réserves de carburants et la prise de conscience des conséquences néfastes des gaz à effet de serre, sous-produits de leur combustion, sur l'environnement ont favorisé la recherche de nouvelles ressources énergétiques, propres et renouvelables. L'hydrogène moléculaire (H_2), que l'on appellera hydrogène par la suite par souci de simplicité, prend toute sa place dans cette optique au travers de la pile à combustible. En effet, ce dispositif permet de produire de l'énergie électrique à partir de la réaction de l'hydrogène avec l'oxygène de l'air en formant de l'eau comme unique sous-produit. Cependant, contrairement à d'autres sources d'énergies primaires comme par exemple les ressources carbonées fossiles, l'hydrogène n'est pas disponible directement. En effet l'élément hydrogène n'est présent que sous forme oxydée sur terre dans différentes sources secondaires comme par exemple dans la molécule d'eau. Il faut donc produire l'hydrogène moléculaire à partir d'autres sources d'énergies. L'enjeu actuel est ainsi de mettre au point un procédé rentable pour produire l'hydrogène à partir de sources renouvelables.

Une réaction de choix de production d'hydrogène est l'électrolyse de l'eau. Cependant, les catalyseurs utilisés actuellement dans ces types de procédés sont majoritairement à base de platine ou d'autres métaux nobles dont le coût rend difficile un développement à grande échelle.¹

Le problème énergétique étant un défi majeur du XXIème siècle nombre de scientifiques y ont focalisé leurs recherches. Un bon moyen de mettre au point de nouveaux catalyseurs pour la production d'hydrogène est de s'inspirer du monde biologique. On trouve en effet dans la Nature des catalyseurs très performants, optimisés depuis des millénaires par le monde vivant et qui n'ont pas d'impact négatif sur notre planète : les enzymes. Ces protéines catalysent en milieux aqueux, avec un faible coût énergétique et dans des conditions généralement douces de température et de pH, des milliers de réactions hautement chimio-, régio-, et stéréosélectives, sans générer de sous-produit toxiques.²

La Nature a ainsi trouvé le moyen de produire de l'hydrogène à partir de l'eau en utilisant uniquement des métaux abondants comme le nickel ou le fer et en les protégeant par une enveloppe protéique au sein des hydrogénases. Ces enzymes, découvertes pour la première fois

en 1931 par Stephenson et Stickland,^{3,4} catalysent la production ou l'oxydation de l'hydrogène moléculaire à partir des protons de l'eau. Leurs structures ont été résolues dans la fin des années 90^{5,6} et leurs mécanismes catalytiques sont partiellement déterminés. Il a été de plus montré qu'elles ont, dans certaines conditions, une activité catalytique similaire au platine.⁷

Les progrès majeurs réalisés en biologie à la fin du XXème siècle, comme par exemple la découverte de la PCR en 1988 par le groupe de Mullis⁸, ont permis le développement, entre autre, de la biologie des protéines et de la biochimie. L'apparition des techniques de séquençage et de biologie moléculaire et structurale a fait évoluer la compréhension des mécanismes de catalyse enzymatique. En parallèle, les progrès de la chimie biomimétique ou bio-inspirée ont permis d'élaborer de nouveaux catalyseurs bio-inorganiques commençant à rivaliser avec les enzymes naturelles.⁹

Bien que la mutagénèse dirigée apparaisse comme une méthode adaptée à la conception de nouvelles générations d'enzymes, l'addition de cofacteurs naturels mais aussi de cofacteurs de synthèse issus de la chimie bio-inspirée semble être une méthodologie puissante pour introduire un large panel de réactivité dans des enzymes dites alors artificielles.

Cette chimie, appelée chimie biosynthétique, s'appuie à la fois sur la chimie des protéines et sur la chimie bio-inspirée. Ces deux disciplines ont notamment été développées dans l'équipe Biocatalyse du Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux afin d'étudier la chimie des enzymes Fe-S ou encore de mettre au point de nouveaux catalyseurs de réduction de protons en hydrogène composés de métaux abondants comme le fer, le nickel ou encore le cobalt. Plus récemment des études ont commencé sur l'insertion de motifs organométalliques dans des enveloppes protéiques afin de voir l'influence de cette enveloppe sur leur stabilité, leurs propriétés électrochimiques ou encore leur activité catalytique.¹⁰

Les travaux présentés dans ce manuscrit vont ainsi s'intéresser à la préparation et à la caractérisation d'enzymes artificielles pour la production d'hydrogène, que l'on appellera hydrogénases artificielles. Ils s'appuient sur l'utilisation de différentes enveloppes protéiques et particulièrement de la myoglobine de cachalot. Il s'agit d'une protéine globulaire de relative petite taille (17331 Da) très utilisée comme enveloppe protéique pour les enzymes artificielles car elle fait partie d'une des premières protéines étudiées et caractérisées. Les catalyseurs insérés dans les enveloppes protéiques sont des catalyseurs à base de cobalt développés dans notre groupe¹¹⁻¹³ et ayant déjà prouvé leurs bonnes activités catalytiques pour la production d'hydrogène.

La présentation de ces travaux s'articulera autour de quatre chapitres. Le premier chapitre est une introduction bibliographique consacrée aux hydrogénases et aux travaux marquants en

chimie biomimétique ainsi qu'en chimie biosynthétique et plus particulièrement sur les enzymes artificielles à base de myoglobine. Les différentes enveloppes protéiques seront présentées dans le second chapitre. Plus particulièrement, après avoir présenté les complexes inorganiques ainsi que les différentes protéines de l'étude (la myoglobine de cachalot, l'hème oxygénase et FixL), nous nous focaliserons sur la production, la purification et la caractérisation de la myoglobine de cachalot, principale protéine hôte pour les catalyseurs de production d'hydrogène. Les hybrides formés seront étudiés et caractérisés spectroscopiquement dans un troisième chapitre. Enfin le dernier chapitre présentera les propriétés électrochimiques et les activités catalytiques obtenues pour ces différentes hydrogénases artificielles.

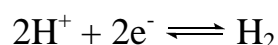
- CHAPITRE I -

Bibliographie

1. Les hydrogénases

1.1. Présentation

Dès les années 1900, des organismes capables d'oxyder l'hydrogène moléculaire ont été découverts. *Bacillus pantotrophus* isolé par Kaserer en 1906¹⁴ en est le premier exemple. Il fallut attendre 1930 et le travail de Stephenson et Stickland sur plusieurs bactéries^{3,4} pour que le nom d'hydrogénase soit donné aux enzymes capables d'activer l'hydrogène moléculaire et/ou de le produire par réaction avec les protons de l'eau (demi-équation électronique écrite ci-dessous). Elles le font à l'équilibre thermodynamique et dans des conditions biologiques, donc souvent douces, c'est-à-dire dans l'eau à pH relativement neutre, à température faible et pression ambiante sauf pour les organismes extrémophiles.¹⁵



Les enzymes sont des protéines particulières capables de catalyser une réaction chimique. Ainsi les méthylthiotransférases (MiaB par exemple) sont capables de réaliser une réaction particulièrement difficile à mettre en œuvre pour le chimiste : l'insertion radicalaire d'un atome de soufre dans une liaison C-H. D'autres enzymes font également des réactions plus faciles du point de vue du chimiste comme par exemple l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde par l'alcool déshydrogénase. Cependant alors qu'industriellement cette réaction se fait à haute température (480°C) avec de l'argent comme catalyseur,¹⁶ l'alcool déshydrogénase réalise cette réaction en conditions physiologiques et ne possède comme métaux que deux atomes de zinc.

Les métaux jouent un rôle important dans le monde biologique. En effet on estime à l'heure actuelle qu'un tiers des protéines du monde vivant nécessitent la présence d'un ou plusieurs ions métalliques comme cofacteurs afin de réaliser leur fonction biologique.¹⁷ Les métaux présents dans ces protéines, appelées alors métalloprotéines ou métallo-enzymes, sont majoritairement des métaux abondants de la première série de transition (à l'exception du scandium, titane et chrome) ainsi que quelques métaux de la seconde et de la troisième série comme le molybdène ou le tungstène par exemple. Ils constituent alors, avec leurs ligands, un groupement prosthétique souvent lié à la chaîne polypeptidique par liaison avec certain(s) acide(s) aminé(s) (comme par exemple les résidus cystéines par l'atome de soufre ou les résidus histidine via l'atome d'azote de l'imidazole) servant alors de ligand(s) complémentaire(s). L'environnement apporté par la protéine module les propriétés physico-chimiques du complexe inorganique aboutissant, lorsque ce dernier est situé au niveau du site actif, lieu de la catalyse enzymatique, à la formation d'un catalyseur optimisé pour la réaction enzymatique voulue.

Les hydrogénases font partie de la grande famille des métallo-enzymes puisqu'elles renferment, dans leur forme active, des cofacteurs biologiques métalliques, comme nous le verrons ci-dessous. Elles ont diverses fonctions métaboliques suivant leur position dans la cellule.¹⁸ Ainsi dans certains organismes photosynthétiques par exemple, comme l'algue verte *Scenedesmus obliquus*,¹⁹ l'hydrogénase exploite les électrons amenés par le photosystème I par l'intermédiaire d'une ferrédoxine (Fd). Cette variante de la photosynthèse conduit à la production d'hydrogène par décomposition de l'eau, le dégagement d'oxygène étant effectué au niveau du photosystème II (figure 1). Le transfert des électrons entre les deux photosystèmes est assuré par des médiateurs mobiles, la plastoquinone PQ et la plastocyanine PC, et par un médiateur fixe le cytochrome $b_6 f$.

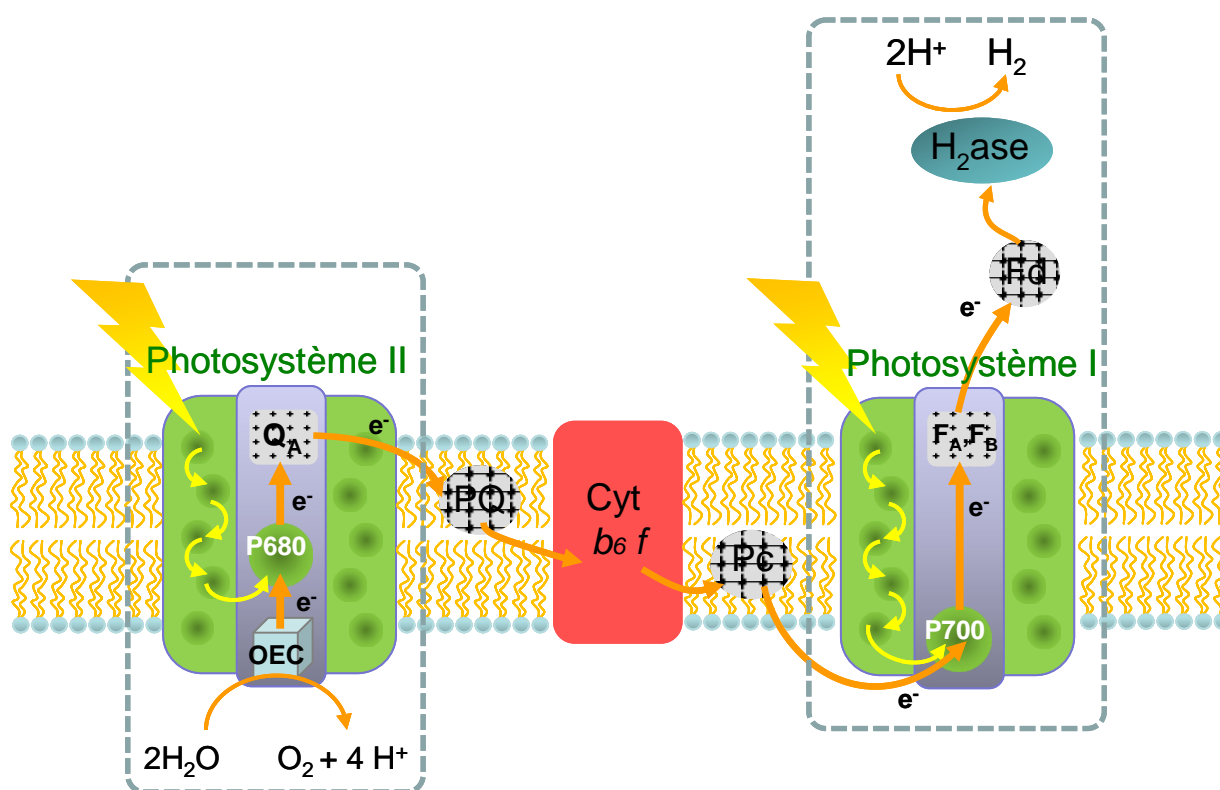


Figure 1. Organisation des différents acteurs de la voie de photosynthèse du dihydrogène moléculaire dans les organismes photosynthétiques (ici l'algue verte *Scenedesmus obliquus*). OEC: « Oxygen Evolving Complex », P680, P700: Chlorophylles absorbant respectivement à 680nm et 700nm, QA: Quinone, PQ: PlastoQuinone, PC: Plastocyanine, FA, FB: centres Fer-Soufre.

Chez les bactéries fermentatives par exemple de type clostridiale les hydrogénases permettent d'évacuer l'excédent d'électrons générés lors de la dégradation de substrat organique comme par exemple le glucose.²⁰ Chez certaines autres bactéries comme la bactérie pourpre non sulfureuse *Rhodobacter sphaeroides* on peut également trouver des hydrogénases associées à

des nitrogénases afin d'éliminer l'hydrogène produit par ces dernières lors de la réduction du diazote en ammoniacque.²⁰

1.2. Classification

Les hydrogénases sont classées suivant la nature de leur site actif. On distingue ainsi les hydrogénases avec un site actif binucléaire composé uniquement de fer comme métal (hydrogénases FeFe), celles, apparentées aux hydrogénases même si fondamentalement elles ne catalysent pas l'interconversion de protons en dihydrogène, dont le site actif est composé d'un complexe mononucléaire de fer (hydrogénase sans cluster fer-soufre, Hmd (pour Hydrogen forming Methylene-tetrahydromethanopterin Dehydrogenase), voire hydrogénase à fer mononucléaire) et enfin celles dont le site actif est composé d'un dinucléaire de nickel et de fer (les hydrogénases NiFe et une sous-classe : les hydrogénases NiFeSe).

1.2.1. Les hydrogénases FeFe

Elles sont présentes chez les eubactéries et les eucaryotes. Elles sont en majorité monomériques et possèdent toutes comme site actif, appelé cluster H, un complexe dinucléaire de Fer (voir figure 3) relié à un cluster 4Fe4S via un soufre pontant. Après quelques incertitudes sur la nature de l'atome central, une étude récente²¹ montre que les atomes de fer de ce complexe sont reliés par un ligand pontant de type dithiométhylamine. La sphère de coordination des atomes de fer est complétée par des ligands cyanures et carbonyles.

Dans la plupart des hydrogénases FeFe, d'autres clusters FeS permettent le relais d'électrons jusqu'à la surface de la protéine tandis que le relais de protons est assuré au travers de liaisons hydrogène entre certains acides aminés. De plus on peut observer dans la structure tertiaire de la protéine la présence d'un canal permettant à l'hydrogène formé au niveau du site actif d'évoluer jusqu'à la surface de la protéine.

La 1^{ère} structure a été résolue en 1998.⁶ Il s'agit de l'hydrogénase FeFe de *Clostridium pasteurianum*. Elle peut être divisée en 4 domaines, le premier possédant le site actif et les trois autres possédant chacun un cluster 4Fe4S comme représenté dans la figure 2.

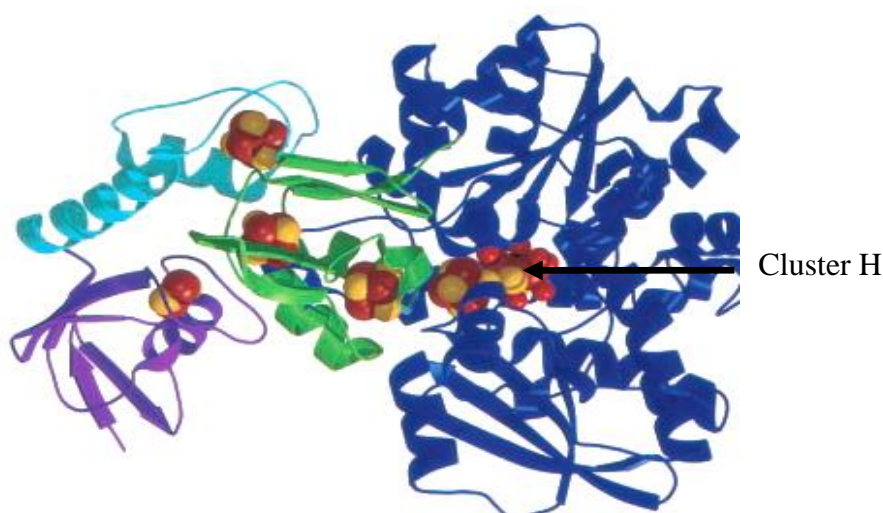


Figure 2. Structure cristallographique de l'hydrogénase Fer-Fer de *Clostridium pasteurianum* à une résolution de 1.8Å avec les 4 domaines de couleur différentes, le site actif (cluster H) et les 4 clusters 4Fe4S.

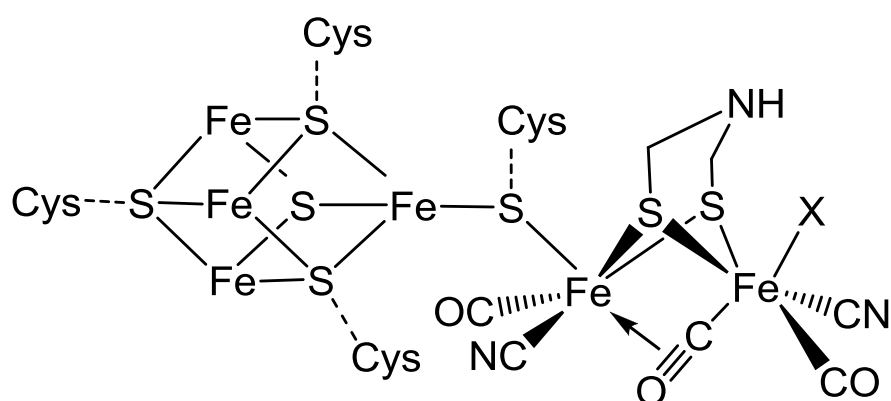


Figure 3. Structure du site actif de l'hydrogénase FeFe. X=H₂O, HO⁻ ou H₂ suivant les conditions. Cys : résidus cystéines de la protéine.

1.2.2. Les hydrogénases Hmd

Il s'agit d'une classe particulière d'hydrogénase. Initialement découverte dans *Methanothermobacter thermoautotrophicum* par l'équipe de Thauer en 1990,²² ces enzymes ont été rattachées aux hydrogénases car elles catalysent réversiblement la réduction du N5,N10-methenyl-tetrahydromethanopterin (methenyl-H₄MPT⁺) avec du dihydrogène en N5,N10-methylene-tetrahydromethanopterin (methylene-H₄MPT), d'où leur nom Hmd.²³

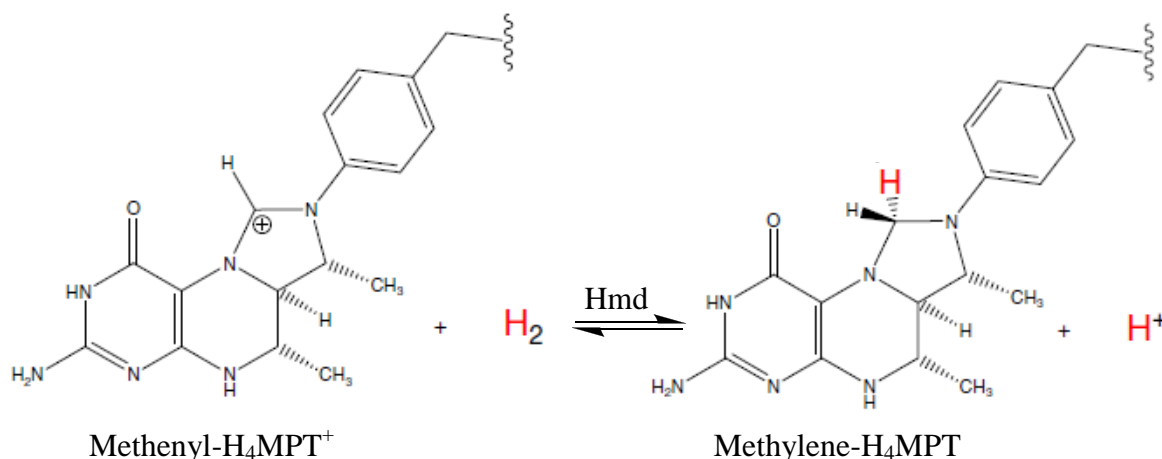


Figure 4. Réaction enzymatique mise en œuvre par l'hydrogénase Hmd.

Initialement appelées hydrogénases sans métal, elles ont été renommées en 2004 après la découverte de la présence d'un atome de fer dans l'enzyme^{24,25} possédant au moins un ligand carbonyle.²⁶ La structure de l'hydrogénase Hmd de *Methanocaldococcus jannaschii* est élucidée en 2008²⁷ et permet, outre le fait de savoir que l'enzyme est structurée en une seule unité d'environ 38kDa, de proposer une structure partielle de son site actif. La structure de son mutant C176A permet de proposer finalement une structure complète en 2009²⁸ représentée ci-dessous.

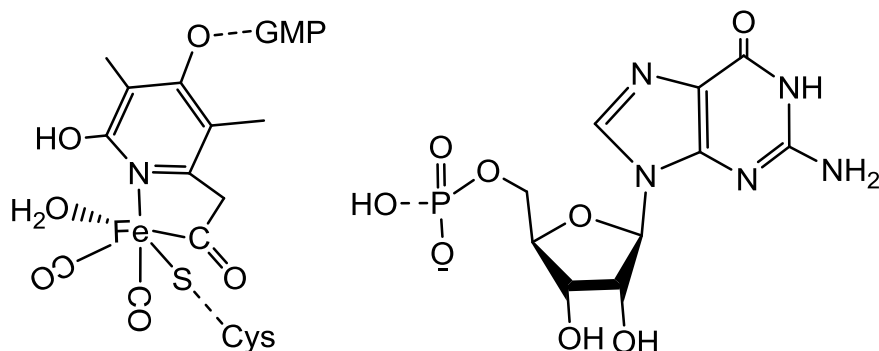


Figure 5. A gauche : Structure du site actif de l'hydrogénase Hmd / GMP : Guanidine MonoPhosphate. A droite : Structure de la guanidine monophosphate.

Le rôle de cet atome de fer n'est pas complètement élucidé. Il semble qu'il ne soit pas impliqué de manière redox dans la réaction mais reste nécessaire à l'activité catalytique.

1.2.3. Les hydrogénases NiFe et NiFeSe

Il s'agit de la plus grande classe des hydrogénases. Elles sont présentes chez les archées et les eubactéries.²⁰ La première résolution de la structure de l'hydrogénase NiFe de *Desulfovibrio gigas* en 1995^{5,29} représentée figure 6, a permis d'identifier la structure de l'enzyme et une

étude complémentaire en 1996 du même groupe a permis de compléter les informations sur son site actif et de clarifier la nature du 2^{ème} centre métallique, le fer. Contrairement aux hydrogénases FeFe, il s'agit d'une protéine globulaire composée de 2 sous unités (28 kDa et 60 kDa chez *Desulfovibrio gigas*). Le site actif, dont la structure est représentée figure 7, est situé dans la grande sous-unité et est plutôt difficile d'accès. Il comprend un atome de nickel et un atome de fer reliés entre eux par deux cystéinates. La sphère de coordination du nickel est complétée par deux autres cystéinates tandis que celle du fer est complétée par deux ligands cyanure et un ligand carbonyle.

La petite sous-unité possède 2 clusters 4Fe4S et un cluster 3Fe4S qui permettent un relais d'électrons de la surface jusqu'au site actif. Le transfert de l'hydrogène se fait grâce au travers de canaux hydrophobes présents dans la protéine. Les études de mutation ou de DFT visant à identifier ces résidus ont conduit à des résultats différents s'expliquant sans doute par l'existence de différents canaux.^{30,31} Le transfert de protons jusqu'au site actif se fait quant à lui par protonations successives de différents résidus. Des études théoriques réalisées en 2008^{32,33} par deux groupes différents proposent un chemin identique impliquant majoritairement des résidus glutamate, deux résidus histidine, un résidu tyrosine (dans l'ordre d'implication : Glu18-His20-His13-Glu16-Tyr44-Glu46-Glu57-Glu73) et des molécules d'eau. Il semble que ce chemin coexiste avec au moins un autre ce qui, du fait de l'importance de l'accès des protons au site actif, est cohérent.

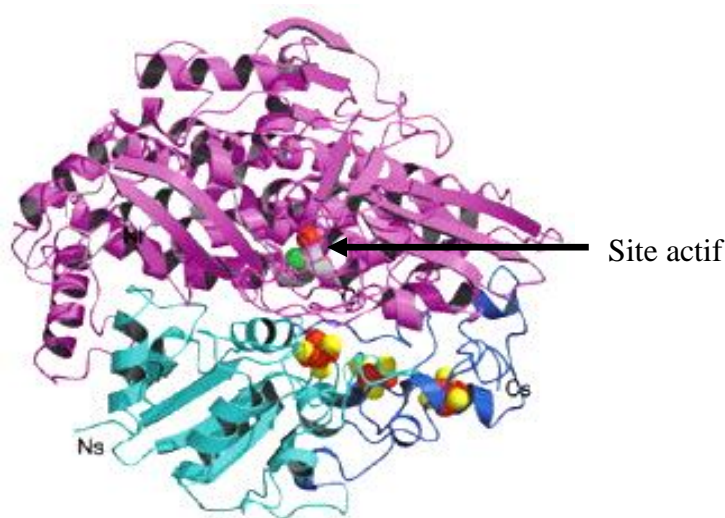


Figure 6. Structure de l'hydrogénase NiFe de *Desulfovibrio gigas*. La grande sous-unité est représentée en rose avec le site actif. La petite sous-unité est en bleue avec les 2 clusters 4Fe4S et le cluster 3Fe4S.

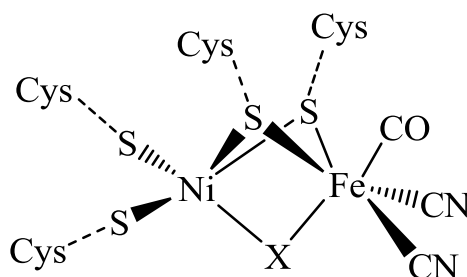


Figure 7. Structure du site actif de l'hydrogénase NiFe. X=H₂O, HO⁻ ou H₂ suivant les conditions. Cys : résidus cystéines de la protéine.

Les hydrogénases NiFeSe forment un sous-groupe des hydrogénases NiFe et sont très présentes chez les bactéries sulfato-réductrices comme *Desulfovibrio*.³⁴⁻³⁶

L'hydrogénase NiFeSe de *Desulfomicrobium baculatum* a été cristallisée sous sa forme active³⁷ et sa structure (figure 8) a pu être comparée à celle de l'hydrogénase NiFe de *Desulfovibrio gigas*. Elles présentent des structures globales très similaires malgré le fait que leur identité de séquence n'est que de 36%. Alors qu'une proline coordonne le cluster 3Fe4S chez *D.gigas* on retrouve chez *D.baculatum* une cystéine qui vient compléter la sphère de coordination de ce cluster en 4Fe4S. Le site actif de l'hydrogénase NiFeSe diffère de celui de l'hydrogénase NiFe par le fait qu'une des cystéines reliées au nickel est remplacée par une sélénocystéine, la sphère de coordination du fer restant inchangée comme on peut le voir figure 9.

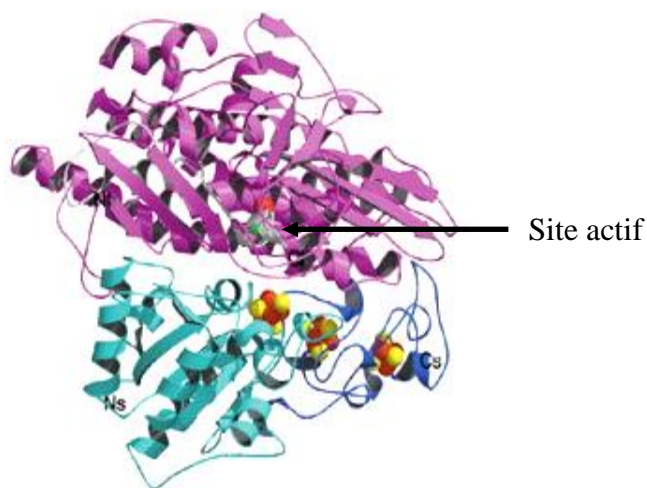


Figure 8. Structure de l'hydrogénase NiFeSe de *Desulfomicrobium baculatum*. La grande sous-unité est représentée en rose avec le site actif. La petite sous-unité est en bleu avec les 3 clusters 4Fe4S.

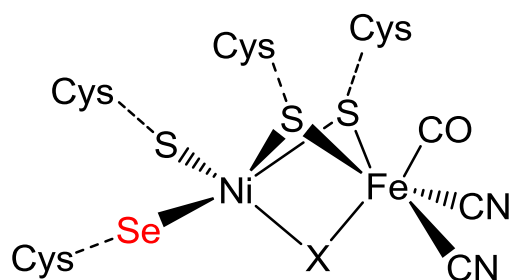


Figure 9. Structure du site actif de l'hydrogénase NiFeSe. X=H₂O, HO⁻ ou H₂ suivant les conditions. Cys : résidus cystéines de la protéine.

Le rôle biologique du sélénium n'est pas encore clairement défini car il possède des propriétés très proches du soufre. Cependant on sait qu'une sélénocystéine, avec un pKa de 5.2, peut donner plus facilement un proton que le thiol d'une cystéine qui a un pKa autour de 8. Cette modification peut expliquer les différences existant entre ces deux enzymes comme par exemple le fait que les hydrogénases NiFeSe sont plus actives en production d'hydrogène qu'en consommation (contrairement aux hydrogénases NiFe).

1.3. Sensibilité à l'oxygène

Il est admis que la majorité des hydrogénases NiFeSe sont ainsi moins sensibles à l'oxygène que leur cousines. Cette sensibilité à l'oxygène est un enjeu majeur à la fois dans la compréhension du mécanisme d'inhibition de centre actif mais également dans l'utilisation de ces enzymes pour la production d'hydrogène en condition aérobie.

Les hydrogénases FeFe et NiFe sont toutes les deux inactivées par l'oxygène. Différentes techniques spectroscopiques, comme par exemple la spectroscopie par résonance paramagnétique électronique ou la spectroscopie infrarouge, ont montré que cette inactivation est due à la coordination du dioxygène sur le site de coordination vacant du site actif de l'hydrogénase (site d'activation de l'hydrogène).³⁸ D'une manière générale, la réaction du site actif de l'hydrogénase FeFe avec le dioxygène inactive rapidement et irréversiblement l'enzyme via la dégradation de ses centres FeS.³⁹ Dans le cas de l'hydrogénase NiFe cette inactivation est réversible. En présence d'oxygène on peut identifier globalement deux états oxydés Ni-A et Ni-B. Ces deux états possèdent un centre Fe(II) bas spin et un centre Ni(III)^{30,39} et peuvent être réduites en présence de réducteur (comme par exemple l'hydrogène) vers une forme active NiSI (Ni^{II}Fe^{II}). L'état NiSI est impliqué dans le mécanisme catalytique de production d'hydrogène avec deux autres états Ni-C et Ni-R obtenus chacun successivement par un transfert couplé électron/proton. La cinétique de cette réduction est lente pour Ni_A que

l'on appelle également état « unready » alors qu'elle est rapide pour Ni-B ou état « ready » (figure 10).⁴⁰ L'état Ni-B est issu de la formation d'un pont hydroxyle entre le nickel et le fer.

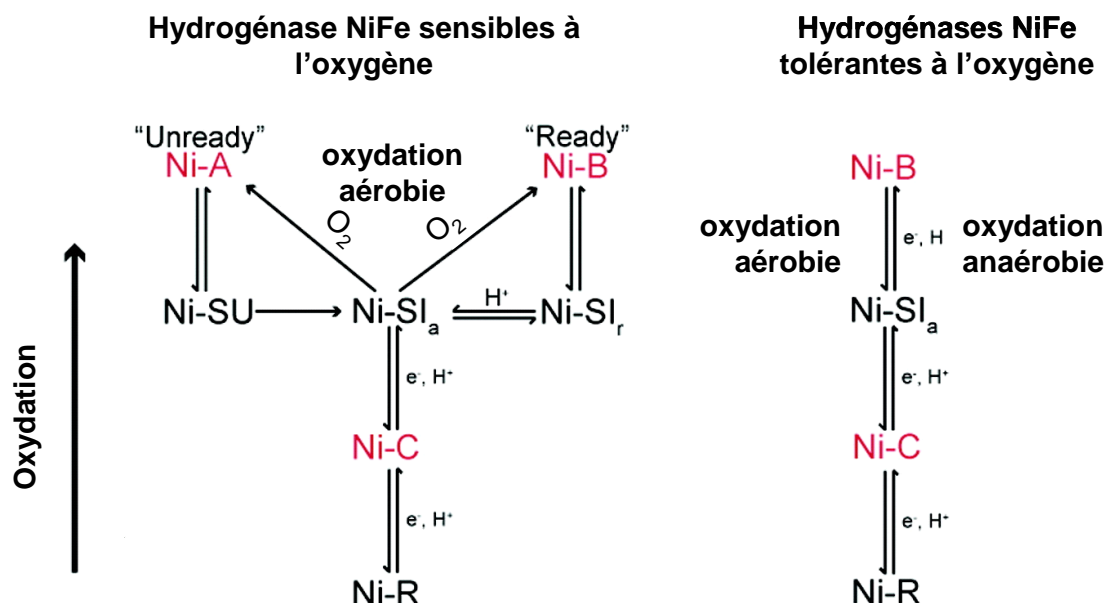


Figure 10. Représentation schématique des différents intermédiaires redox du site actif dans les hydrogénases NiFe sensibles (à gauche) et tolérantes (à droite) à l'oxygène.⁴⁰

Les hydrogénases tolérantes à l'oxygène forment préférentiellement uniquement un état Ni-B qui, de plus, se réactive encore plus rapidement que l'état Ni-B des hydrogénases sensibles à l'oxygène. Les études des structures ou des séquences d'hydrogénases NiFe tolérantes à l'oxygène (de *Ralstonia eutropha*⁴¹, d'*Aquifex aeolicus*⁴², ou encore de *Hydrogenovibrio marinus*⁴³ par exemple) ont permis de mieux comprendre les facteurs influençant la tolérance à l'oxygène. Dans les hydrogénases tolérantes à l'oxygène le cluster 4Fe4S proximal possède un environnement riche en cystéine (avec 6 résidus cystéines au lieu de 4 dans les hydrogénases sensibles à l'oxygène). L'équipe de Lenz⁴⁴ a ainsi pu augmenter considérablement la sensibilité à l'oxygène de l'hydrogénase NiFe de *Ralstonia eutropha* en mutant les deux résidus cystéine supplémentaires par deux résidus glutamate.

Les conséquences mécanistiques de la présence de ces deux résidus cystéines supplémentaires ne sont pas à l'heure actuelle parfaitement définies. Ainsi, l'équipe de Lubitz⁴² a montré qu'ils permettent de stabiliser l'état superoxydé ($[4Fe4S]^{3+}$) pouvant se former par oxydation par l'oxygène. Le cluster proximal peut alors protéger le site actif de l'oxydation par des espèces réactives de l'oxygène et éviter ainsi la formation de Ni-A. Cependant, Christophe Léger⁴⁵ et ses collaborateurs ont montré récemment que l'espèce Ni-A peut être formée en absence d'oxygène, remettant en cause l'analyse précédente.

1.4. Activité enzymatique et électrochimie

L'activité des hydrogénases peut être mesurée de différentes manières. Classiquement on peut doser l'hydrogène formé par ajout d'un réducteur (méthylviologène ou benzylviologène généralement) par chromatographie en phase gazeuse.^{46,47}

L'activité enzymatique des hydrogénases dépend de leur nature mais surtout de l'organisme dont elles sont issues.³⁹

Les hydrogénases FeFe sont surtout actives en production d'hydrogène : 9000 (*Megasphaera elsdenii*) et 50000 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ d'enzyme (*D. Gigas*) contre 10 (H_2 ase II de *Clostridium pasteurianum*) à 10400 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ d'enzyme (*D. Gigas*) en consommation d'hydrogène.⁴⁸

Les hydrogénases NiFe sont moins actives que les hydrogénases FeFe en production et en oxydation de l'hydrogène. Elles restent plus actives en oxydation de l'hydrogène qu'en réduction de protons (440 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ d'enzyme en production et 1500 en oxydation par exemple pour l'hydrogénase de *D. Gigas*⁴⁸). Les hydrogénases NiFeSe semblent plus actives que les hydrogénases NiFe que ce soit en production ou en consommation. On peut noter, par exemple, une activité pour les hydrogénases *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (*DvH*) NiFeSe, NiFe et FeFe respectivement de 6908, 174 et 4800 $\mu\text{mol H}_2 / \text{min} / \text{mg}$ en production d'hydrogène et de 900, 89 et 50000 $\mu\text{mol H}_2 / \text{min} / \text{mg}$ d'enzyme en consommation d'hydrogène (tableau 1).⁴⁷

	<i>DvH</i> NiFeSe	<i>DvH</i> NiFe	<i>DvH</i> FeFe
Production	6 908	174	4 800
Consommation	900	89	50 000

Tableau 1. Activité de production d'hydrogène des hydrogénases NiFeSe, NiFe et FeFe de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (*DvH*) en $\mu\text{mol H}_2 / \text{min} / \text{mg}$ d'enzyme.

On peut également avoir un accès direct à l'activité enzymatique par des techniques électrochimiques. Les hydrogénases interagissent en effet naturellement avec certaines électrodes de travail comme par exemple les électrodes de carbone graphite.⁷ Armstrong et ses collaborateurs ont pu par cette technique mesurer une activité d'oxydation de l'hydrogène en protons de 6000 cycles catalytiques/s pour l'hydrogénase NiFe d'*Allochrodatum vinosum*.

L'étude de ces électrodes modifiées nous donne accès à la fois à la vitesse de la réaction enzymatique mais également aux mécanismes d'activation/inactivation.^{49,50}

1.5. Applications technologiques

De par leur très grande activité ces enzymes tendent à être utilisées pour des applications biotechnologiques.¹⁹ Un grand nombre d'études ont été décrites portant sur l'utilisation de microalgues dans des biophotoréacteurs pour la production d'hydrogène via leur hydrogénase naturelle. On peut également produire de l'hydrogène par photofermentation du glucose par des bactéries photosynthétiques comme *Rhodobacter capsulatus*. L'optimisation de ces procédés peut se faire via l'optimisation du réacteur et des conditions de culture mais également via des mutations précises du génome permettant de rediriger le flux d'électrons internes des cellules vers les hydrogénases afin d'optimiser la quantité d'hydrogène produit.^{51,52}

On peut cependant également utiliser uniquement l'enzyme purifiée comme catalyseur dans des biopiles à combustible. Cette méthode s'est développée avec les techniques de fixation d'enzymes sur électrode. Il est donc actuellement possible de fonctionnaliser des électrodes avec des hydrogénases et d'utiliser ces électrodes comme cathodes de biopiles à combustible.^{53,54}

2. Chimie bio-inspirée et chimie biomimétique

2.1. De l'étude des sites actifs à de nouveaux catalyseurs

L'élucidation de la structure des sites actifs des hydrogénases, et plus généralement des enzymes, conduisant à une meilleure compréhension du monde du vivant, a permis de compléter les données structurales déduites des études spectroscopiques plus anciennes. Ainsi dès les années 1980⁵⁵ on a vu apparaître une nouvelle chimie dite bio-inspirée ou biomimétique s'appuyant sur ces études. Comme son nom l'indique, l'idée est de s'inspirer du monde biologique, grâce aux données spectroscopiques et structurales obtenues par l'étude des enzymes, afin de mettre au point de nouveaux catalyseurs mimant le site actif des enzymes. Par cette méthode on peut s'affranchir de certains inconvénients de ces enzymes que sont leur grande taille, leur sensibilité aux conditions du milieu ou encore leur production plus complexe.⁵⁶ Ainsi des études physicochimiques et/ou cristallographiques du site actif de l'enzyme permettent d'identifier une structure ou des arrangements structuraux clés de l'activité. On peut alors synthétiser des molécules se rapprochant au mieux de ses caractéristiques. Ces analogues synthétiques, plus petits et plus facilement cristallisables, peuvent être séparés en deux groupes : les analogues structuraux possédant une très grande

ressemblance avec le site actif de l'enzyme en reproduisant les ligands, la stéréochimie ou encore l'état d'oxydation du métal (ou des métaux) et les analogues fonctionnels ayant une activité similaire, quoique souvent plus faible, à l'activité enzymatique.

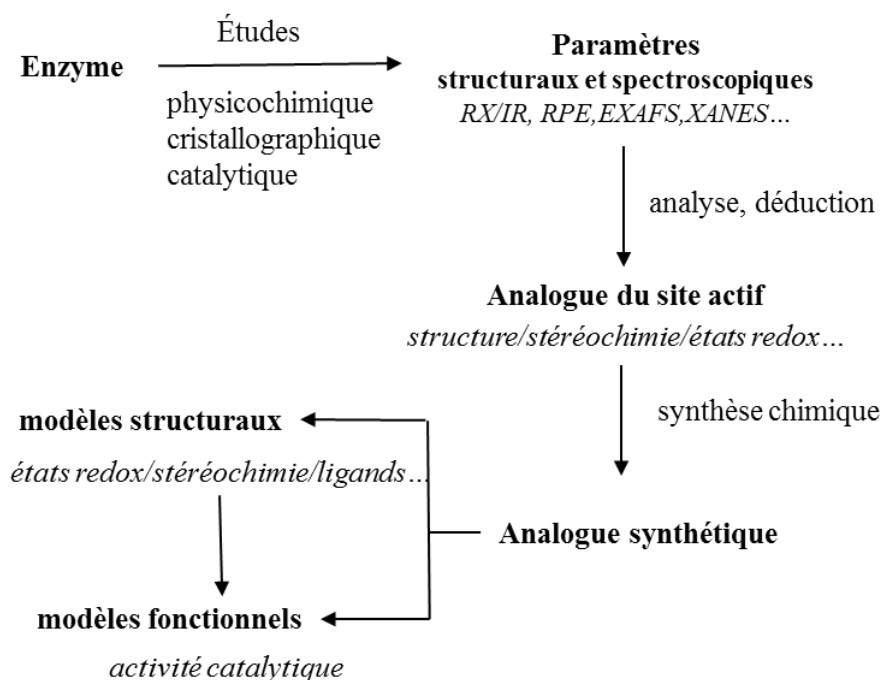


Figure 11. Principe de la chimie biomimétique. Démarche conduisant à la préparation d'analogues synthétiques (fonctionnels et structuraux).

2.2. Etude catalytique

La réaction de production d'hydrogène à partir de proton impliquant des échanges électroniques, les méthodes électrochimiques sont des méthodes de choix pour étudier leur activité catalytique.

Comme on l'a vu précédemment, l'étude de voltammogrammes cycliques apporte des connaissances à la fois sur les propriétés électrochimiques du catalyseur (potentiels des différents couples impliqués dans la catalyse) et sur le mécanisme réactionnel lorsqu'elle est associée à des études théoriques.

En effet la première caractérisation d'une activité catalytique de production d'hydrogène est faite au travers de l'observation, en présence d'une concentration croissante d'acide (servant de source de protons), d'une vague catalytique irréversible caractéristique. La mesure du courant en fonction du potentiel appliqué se fait grâce à une électrode de travail inerte dans ces conditions et donc généralement une électrode de carbone vitreux ou encore une nappe de mercure. Les voltammogrammes cycliques obtenus avec la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgH})_2\text{pyCl}]$ sont représentés figure 12.

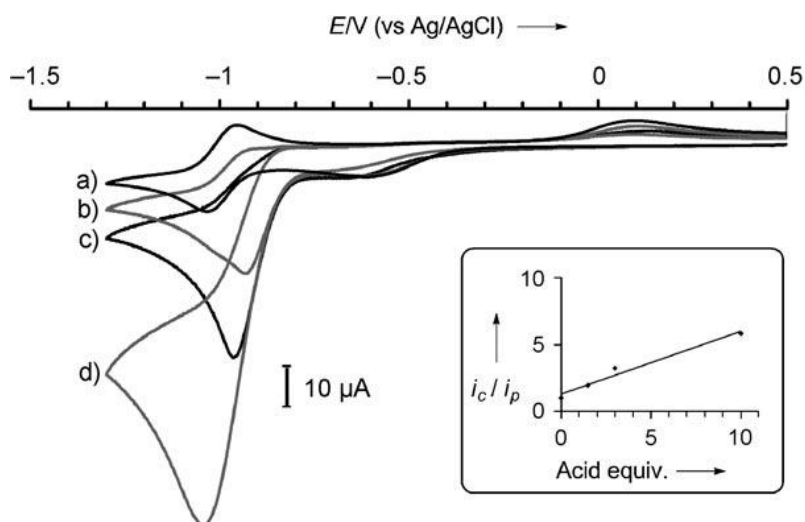


Figure 12. Voltammogrammes cycliques de $[\text{Co}(\text{dmgbF}_2)_2\text{pyCl}]$ avec différentes concentrations de Et_3NHCl enregistrés dans une solution de tétrafluoroborate de tétrabutyle ammonium (TBA/TFB) 0,1M dans du DMF contre une électrode de carbone à 100 mV/s. a) 0 eq, b) 1,5 eq, c) 3 eq, d) 10 eq.

Comme les mesures sont faites dans des conditions toujours différentes il nous faut extraire des voltammogrammes cycliques et des électrolyses des données permettant la comparaison des différents catalyseurs entre eux.

La première donnée importante est le potentiel de la vague catalytique qui dépend à la fois de la nature du catalyseur, de l'acide et du solvant utilisés. Ce potentiel nous donne accès à un paramètre important du catalyseur : la surtension minimale nécessaire à l'observation d'une activité catalytique. Elle peut être définie d'un point de vue thermodynamique comme la différence de potentiel électrochimique à appliquer par rapport au potentiel standard du couple H^+/H_2 pour que la réaction ait lieu avec une cinétique appréciable.

Une fois ce potentiel mesuré, on peut confirmer la formation de d'hydrogène et mesurer la capacité catalytique du catalyseur dans ces conditions. Pour ce faire il faut apporter des électrons de potentiel suffisamment bas à notre système.

Une première méthode particulièrement utilisée est l'électrolyse. Le potentiel d'électrolyse est fixé au potentiel de la vague catalytique et la quantité d'hydrogène formée est souvent quantifiée par chromatographie gazeuse. Au lieu d'être apportés par un potentiostat, les électrons peuvent être apportés par un réducteur chimique ou encore par un donneur d'électrons sacrificiel via un photosensibilisateur. Dans ces conditions, il faut que le potentiel du réducteur ou du photosensibilisateur soit plus négatif que le potentiel de la vague catalytique de production d'hydrogène observée en voltammétrie cyclique.

On a alors accès à un deuxième paramètre important du catalyseur : le nombre de cycles catalytiques qu'il peut effectuer (TON ou TurnOver Number = Quantité d'hydrogène formé/

quantité de catalyseur en présence d'un excès d'électrons et de protons) pour une durée définie ou sa fréquence catalytique (TOF ou TurnOver Frequency, exprimé en TON.s^{-1} ou TON.h^{-1}).

L'expérience d'électrolyse nous permet également de quantifier la sélectivité du catalyseur : le rendement faradique. Il s'agit du quotient entre la quantité de dihydrogène formé et la moitié de la charge traversant la cellule électrochimique. Si le rendement faradique est inférieur à 1, cela signifie qu'une partie de la charge électronique est impliquée dans une autre réaction ou la dégradation du catalyseur.

2.3. Modèles du site actif des hydrogénases

Comme pour d'autres enzymes on a vu apparaître des analogues synthétiques des hydrogénases avant même la résolution de leurs structures mais cette étape clé a permis leur développement exponentiel.

2.3.1. Analogues synthétiques du site actif des hydrogénases FeFe

2.3.1.1. Les structures

La résolution de la structure du site actif des hydrogénases FeFe a mis en évidence la ressemblance entre ce dernier et la famille de complexes $[\text{Fe}_2(\text{CO})_6(\mu\text{-SR})_2]$ (R = groupe organique) (**1-6**) développée par le groupe de Reihlen dès 1929.⁵⁷ D'autres groupes, comme par exemple celui de Seyferth,⁵⁸ ont continué à développer cette chimie des complexes renfermant un motif $\{2\text{Fe}2\text{S}\}$.

En 1999 les groupes de Rauchfuss⁵⁹, Darensbourg⁶⁰ et Pickett⁶¹ montrent que l'échange de deux ligands carbonyles par deux ligands cyanures (**3**) permet d'obtenir des complexes solubles dans l'eau. L'autre modification majeure est apportée par la modification du pont propylène avec le remplacement du groupe CH_2 central par un oxygène, un azote ou une amine tertiaire fonctionnalisée (**4-6**).

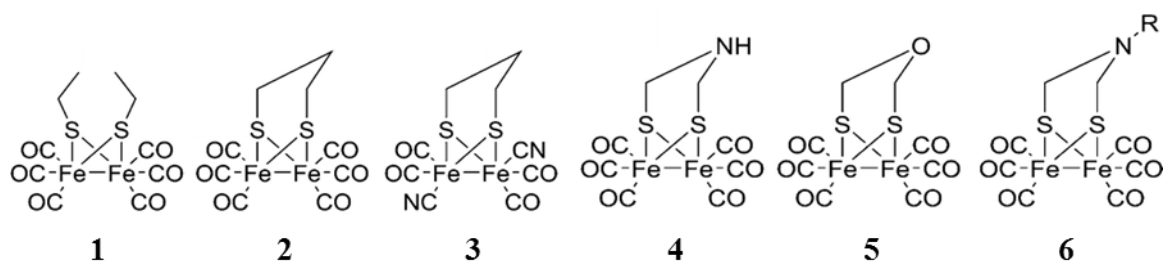


Figure 13. Exemples de complexes dinucléaires de Fer mimant le site actif des hydrogénases FeFe.

Chaque modification influence les propriétés électrochimiques des complexes en plus de leur solubilité dans l'eau et de leur stabilité.

Il y a chaque année un grand nombre de publications sur ce domaine présentant la synthèse de complexes plus ou moins proches structurellement du site actif. On peut noter dans ce cadre l'utilisation de ligands phosphine, comme substitut des ligands cyanure par les groupes de Rauchfuss⁶², Ott⁶³ ou Darensbourg.⁶⁴ Ainsi le groupe de Rauchfuss⁶² a inséré un groupement phosphine à la place d'un ligand carbonyle dans le complexe (3). Cette modification a permis d'améliorer la stabilité du composé ((3) forme un précipité par polymérisation en présence de protons⁵⁹) et de lui conférer une activité catalytique avec la production de quatre molécules d'hydrogène pour une molécule de complexe.

La modification des ligands originaux a également permis de se rapprocher de la structure du site actif avec le développement de modèles complets du cluster H : Le groupe de Pickett⁶⁵ a notamment remplacé le ligand propanedithiolate par un ligand tridentate composé de trois thiolates et a ainsi utilisé ce troisième thiolate comme ligand pontant entre un des atomes de fer du complexe binucléaire et le fer différencié d'un cluster 4Fe4S synthétique.

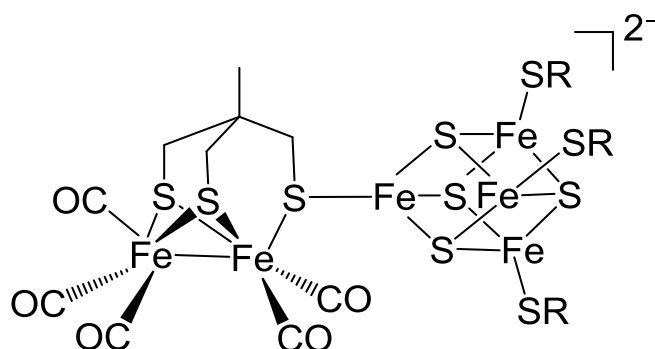


Figure 14. Structure du complexe dinucléaire FeFe coordonné à un cluster 4Fe4S modifié. R= 1,3,5-tris (4,6-diméthyl-3-mercaptophénylthio)-2,4,6-tris (p-tolyl-thio)benzene).

Il a été alors montré par études électrochimiques qu'il existe une communication électronique entre l'entité dinucléaire et le cluster.

2.3.1.2. Activités catalytiques

Les différents complexes biomimétiques du site actif des hydrogénases FeFe ont montré dans la grande majorité des activités catalytiques pour la production d'hydrogène. Ils restent cependant encore loin de l'activité catalytique des hydrogénases FeFe.

On peut majoritairement noter trois points caractéristiques de l'activité d'un complexe inorganique que l'on peut illustrer au travers des modèles dinucléaire de fer. Le premier point est relatif au potentiel négatif (appelé surtension) qu'il faut appliquer en électrolyse pour observer l'activité catalytique des modèles chimiques. Tout l'enjeu est donc de mettre au point

des catalyseurs nécessitant des surtensions faibles pour se rapprocher de l'activité des hydrogénases qui réalisent la réduction de protons à une surtension nulle. Le deuxième point, souvent relié à la surtension, concerne la réaction de protonation de l'hydrure formé. En effet, il est souvent nécessaire d'utiliser des acides forts comme donneurs de protons dans le cas des catalyseurs biomimétiques alors que l'hydrogénase est active autour de pH 7. La présence de l'amine pontante joue un rôle majeur que ce soit dans l'hydrogénase que dans les complexes mimétiques. En effet il a été montré²¹ que la présence d'une amine dans le pont azadithiolate (adt) présent entre les deux atomes de fer du site actif de l'hydrogénase est indispensable à son activité catalytique puisque l'hydrogénase reconstituée avec le même complexe dinucléaire de fer portant un atome d'oxygène (odt pour oxodithiolate) ou de carbone (pdt pour propanedithiolate) comme atome central du pont disulfure n'a pas d'activité catalytique.

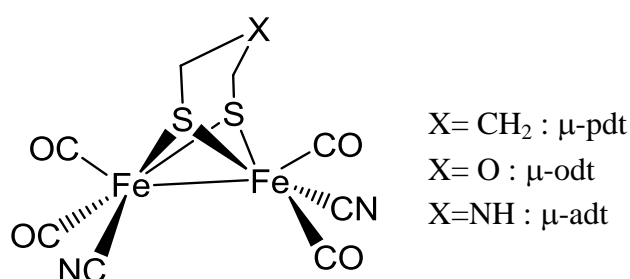


Figure 15. Structure des complexes $[\text{Fe}_2(\text{CO})_4(\text{CN})_2(\mu-(\text{SCH}_2\text{XCH}_2\text{S}))]$ avec la nomenclature associée dans le cas où $X = \text{CH}_2$, $X = \text{O}$ et $X = \text{NH}$.

On peut noter une différence structurale majeure entre le site actif de l'hydrogénase FeFe et la majorité des complexes biomimétiques développés jusqu'alors relative à la formation de l'hydrure sur le complexe. Dans le cas de l'hydrogénase FeFe il y a formation d'un hydrure terminal sur le site vacant du fer comme on l'a vu sur la structure du site actif figure 3. Les modèles synthétisés jusqu'alors forment majoritairement un hydrure pontant entre les deux atomes de fer. L'existence de cet hydrure pontant rend le transfert de protons et la formation de la liaison H-H plus difficile et plus lent.⁶⁶ De plus, il a été montré que les hydrures terminaux se réduisent à des potentiels plus faibles.⁶⁷

De la même manière, Rauchfuss a pu montrer qu'en présence d'acide faible ($\text{pK}_a = 6.8$), le complexe $[\text{Fe}_2(\mu\text{-adt})(\text{CO})_2(\text{dppv})_2]$ (dont les deux atomes de fer sont substitués par des ligands phosphines, $\text{dppv} = \text{cis-1,2-bis(diphenylphosphino)ethylene}$) est actif alors que les complexes similaires avec un pont oxodithiolate ou propane dithiolate ne le sont pas. Ces derniers sont pourtant actifs si on stabilise la formation de l'hydrure terminal associé en travaillant à faible température (-20°C). Cette différence d'activité catalytique est donc due à une protonation plus

difficile des hydrures associés aux complexes $[\text{Fe}_2(\mu\text{-odt})(\text{CO})_2(\text{dppv})_2]$ et $[\text{Fe}_2(\mu\text{-pdt})(\text{CO})_2(\text{dppv})_2]$ par rapport à $[\text{Fe}_2(\mu\text{-adt})(\text{CO})_2(\text{dppv})_2]$.⁶⁸

Enfin, le dernier point concerne l'activité catalytique globale des systèmes.

Ces trois paramètres sont dépendants les uns des autres et sont influencés considérablement par la nature de l'atome central du pont dithiolate entre les deux fers comme on l'a vu mais plus généralement par la nature de tous les ligands. Des progrès constants sont réalisés avec la mise au point de catalyseurs de plus en plus performants. Il s'agit d'un domaine vaste de par la grande versatilité des ligands possibles comme cela est représenté figure 16.^{65,69-72}

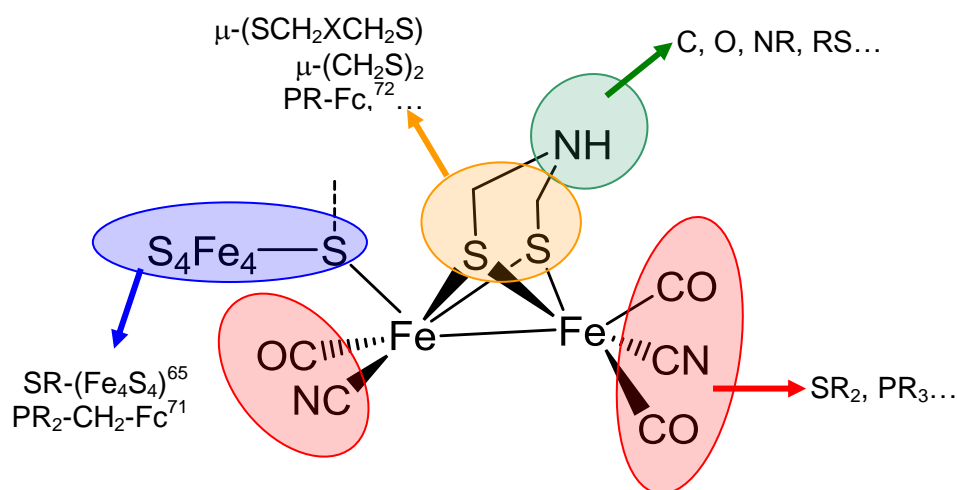


Figure 16. Modifications possibles du cluster H.

On peut noter par exemple l'activité du catalyseur $[\text{Fe}_2(\mu\text{-R-adt})(\text{CO})_6]$ pour lequel le pont azadithiolate est fonctionnalisé par un groupement bromophényl. Ce complexe catalyse la production d'hydrogène en milieux acide (H_2SO_4 0.5M) avec une surtension faible de -0.5V. Il possède une des meilleures activités catalytiques à l'heure actuelle pour cette famille de complexe avec environ 6000 cycles catalytiques par seconde pendant au moins 8h.⁷³

On peut noter également le complexe synthétisé par le groupe de Rauchfuss⁷¹ possédant une activité catalytique à la fois en réduction et en oxydation. L'activité catalytique en oxydation est apportée par un motif ferrocène couplé au complexe dinucléaire. Le ferrocène joue le rôle d'accepteur d'électrons de faible potentiel et de ce fait peut mimer la présence du cluster $4\text{Fe}_4\text{S}$ relié au complexe dinucléaire de fer dans le cluster H.⁷⁴ Même si l'activité catalytique d'oxydation du dihydrogène est faible avec 0.4 cycles catalytiques/h il s'agit de l'unique complexe mimétique réversiblement actif comme l'hydrogénase.

2.3.2. Analogues synthétiques du site actif des hydrogénases NiFe^{75,76}

Avant la résolution de la structure de l'hydrogénase NiFe de *Desulfovibrio gigas* en 1995 la communauté scientifique pensait que le site actif était un complexe mononucléaire ou dinucléaire de nickel. Dans ce cadre, un grand nombre de complexes mononucléaires et dinucléaires de nickel ont été développés mais nous nous concentrerons ici aux modèles structuraux dinucléaires nickel-fer mimant réellement la structure du site actif. Cette chimie n'a pris de l'ampleur qu'après 1995.

Le premier complexe de ce type (**7**), dont la structure est représentée figure 17, a été développé par le groupe de Darensbourg en 1996⁷⁷ mais ne possédait pas les deux ponts thiolates entre le fer et le nickel comme cela est le cas dans le site actif. Différentes substitutions sont possibles; on peut noter par exemple le complexe (**8**) (figure 17) décrit par Schröder en 2006.⁷⁸ Dans cette famille de complexes, le fer est relié au nickel par un seul ligand soufré ce qui entraîne une plus grande flexibilité du ligand et une distance Ni-Fe plus grande que celle déterminée pour le site actif de l'enzyme.

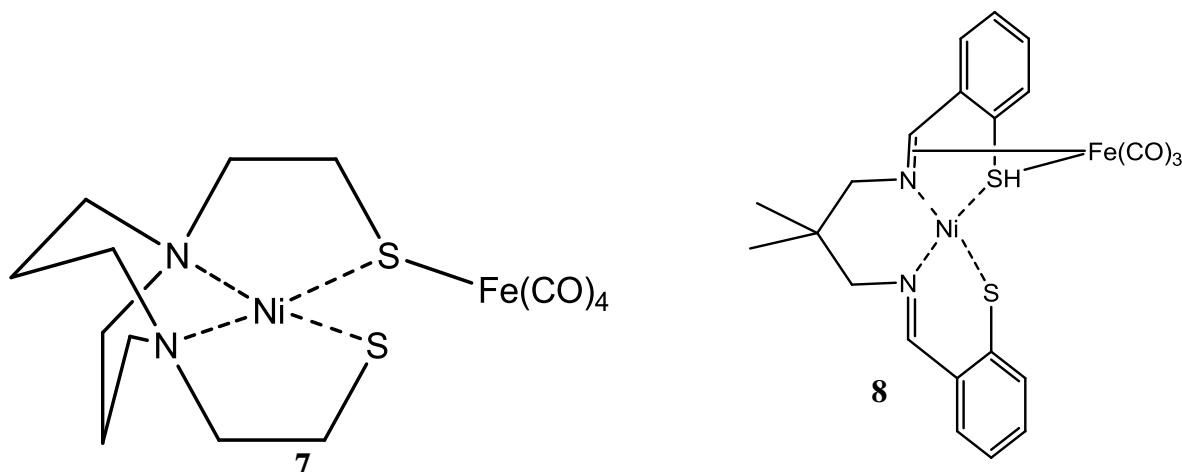


Figure 17. Complexes dinucléaires NiFe avec un centre $\text{Fe}(\text{CO})_x$ rattaché à un complexe de nickel.

En 1997, Pohl⁷⁹ a décrit la synthèse d'un premier complexe bis-thiolatoponté (**9**) (figure 18) donnant une géométrie plus ressemblante au site actif et rapprochant le nickel et le fer avec une distance de 2,9Å similaire à celle que l'on observe dans l'hydrogénase. La sphère de coordination du fer est alors complétée par des ligands nitrosyle.

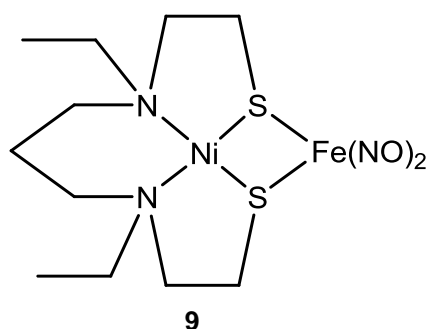


Figure 18. Complexe dinucléaire NiFe bis-thiolatoponté.

Finalement c'est le groupe d'Evans qui proposa en 1999⁸⁰ le premier analogue synthétique (**10**) avec des propriétés structurales similaires au site actif des hydrogénases NiFe à savoir un pont dithiolate entre le nickel et le fer ainsi que des ligands carbonyles pour le fer. De plus, dans ce complexe, le nickel a une géométrie pseudopyramidale à base carrée que l'on retrouve dans la forme oxydée du site actif de l'enzyme. On peut remarquer que ce complexe possède également quelques similarités avec le cluster A ((**11**) figure 19 à droite) d'une enzyme bifonctionnelle : la carbone monooxyde deshydrogénase / acetyl-CoA synthase (CODH/ACS). Le cluster A est responsable de l'activité acetyl-CoA synthase. En effet on retrouve les ponts 2-aminoethanethiol, ligands du nickel dans le site actif,⁸¹ comme ligands du fer dans ce complexe biosynthétique ainsi que les deux ligands soufrés pontant entre les deux métaux ((**10**) figure 19 à gauche).

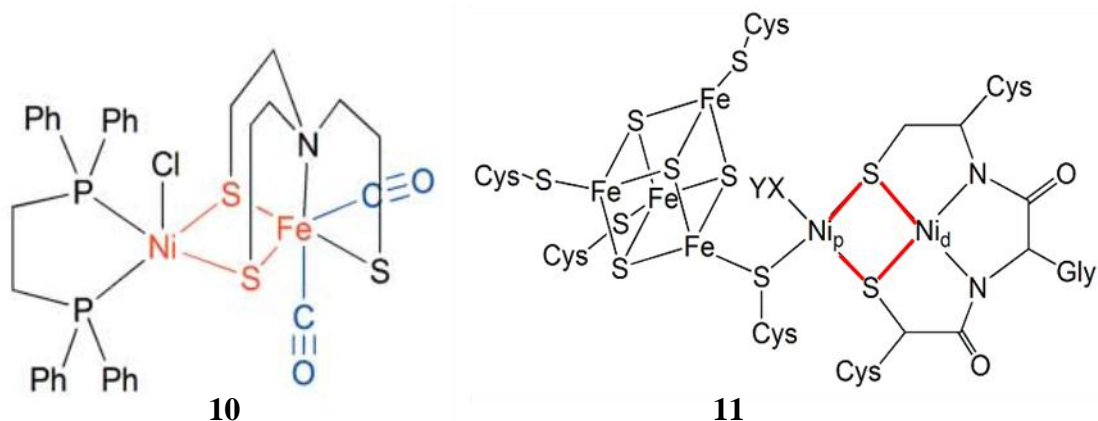


Figure 19. Gauche : Complexe dinucléaire NiFe (**10**) avec un pont dithiolate entre le nickel et le fer ainsi que des ligands carbonyle pour le fer. Droite : cluster A de CODH/ACS.

En 2005, le groupe de Schröder⁸² a décrit un complexe dinucléaire Nickel-Fer (**12**) stable à l'état réduit $\text{Ni}^{\text{I}}\text{Fe}^{\text{I}}$ présentant un pont propylènedithiolate comme ligand commun au nickel et au fer. La sphère de coordination du nickel est encore complétée par des ligands phosphines.

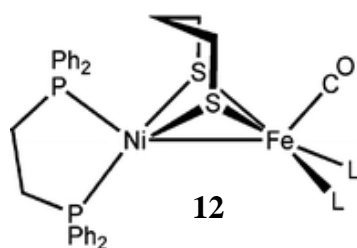


Figure 20. Structure du complexe $\text{Ni}^{\text{I}}\text{Fe}^{\text{I}}$ synthétisé par le groupe de Schröder.

La même année, le groupe de Tatsumi⁸³ a quant à lui mis au point la synthèse de complexes dinucléaires nickel-fer avec des ligands carbonyle et cyanure pour le fer.

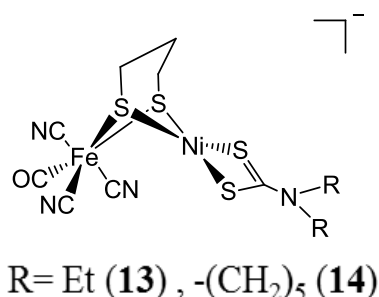


Figure 21. Schéma de synthèse de complexes dinucléaires nickel-fer avec des ligands CO et CN^- pour le fer et un pont propanedithiolate entre le nickel et le fer.

Les complexes **13** et **14** présentent des caractéristiques structurales ainsi que des distances métal-métal et métal-soufre similaires aux formes oxydées des sites actifs des hydrogénases *Desulfovibrio gigas* (*D. gigas*) et *Desulfovibrio fructosovorans* (*D. fructosovorans*).⁸³

Distances (Å)	13	14	<i>D. gigas</i>	<i>D. fructosovorans</i>
Fe-Ni	3,0587 (6)	3,0364(8)	2,9	2,9
Fe-S-Ni*	84,43	84,71	73,7	nd
Fe-S (pont)*	2,337	2,338	2,2	2,4
Ni-S (pont)*	2,213	2,111	2,6	2,4
Ni-S (terminal)*	2,206	2,209	2,2	2,3

Tableau 2. Distances (Å) des différentes liaisons et angles caractéristiques des complexes **13**, **14** et des sites actifs de *D. gigas* et *D. fructosovorans*. * : moyenne. nd : donnée non disponible sur la banque de données des protéines.

Cependant les complexes décrits jusqu'à présent ne possèdent pas d'activité catalytique pour la réduction de protons, ou du moins elle n'a jamais été testée.

On ne dénombre en effet qu'un petit nombre d'analogues synthétiques du site actif des hydrogénases NiFe catalytiquement actifs pour la production d'hydrogène⁸⁴⁻⁸⁸

Ainsi, le groupe de Rauchfuss a synthétisé en 2009^{87,88} une série de complexes dinucléaires NiFe avec des ligands phosphine pour la première fois actifs pour la production d'hydrogène. Il s'est basé sur le complexe (**12**) et a pu, en présence de protons, former l'hydruire pontant correspondant (**15**) qui s'est révélé très stable et responsable de l'activité catalytique. On peut noter cependant que ces complexes ne sont actifs qu'en imposant un potentiel beaucoup plus négatif que le potentiel d'équilibre du couple H^+/H_2 correspondant à une surtension d'environ 1V.⁸⁶

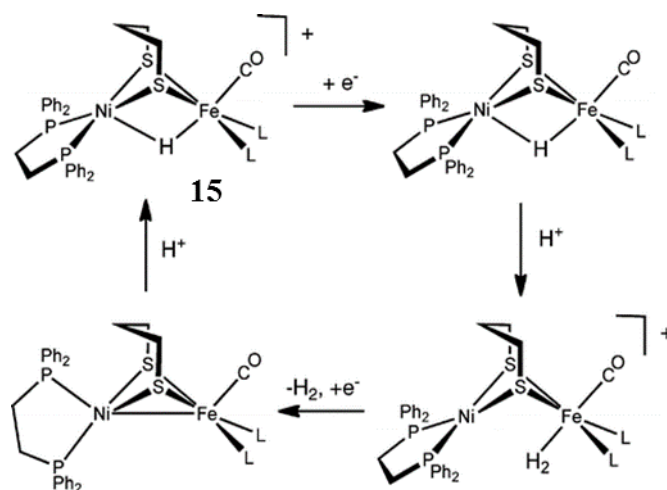


Figure 22. Cycle catalytique proposé pour les complexes dinucléaires NiFe avec $L = CO, P(OPh)_3, PPh_3$ ou PPh_2py .

De manière concomitante, notre groupe⁸⁶ a proposé un autre complexe dinucléaire également catalytiquement actif pour la production d'hydrogène moléculaire avec une surtension de 730mV.

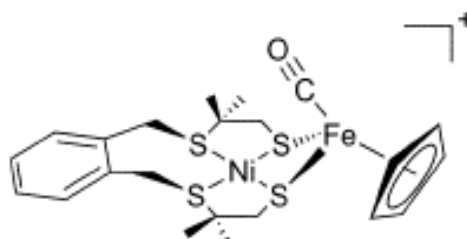


Figure 23. Structure du complexe sous sa forme active pour la production d'hydrogène.

Enfin, on peut noter dans ce cadre le très récent travail du groupe de S. Ogo⁸⁴ qui a préparé un complexe binucléaire NiFe (**16**) actif à la fois en réduction de protons et pour l'activation de H_2 .

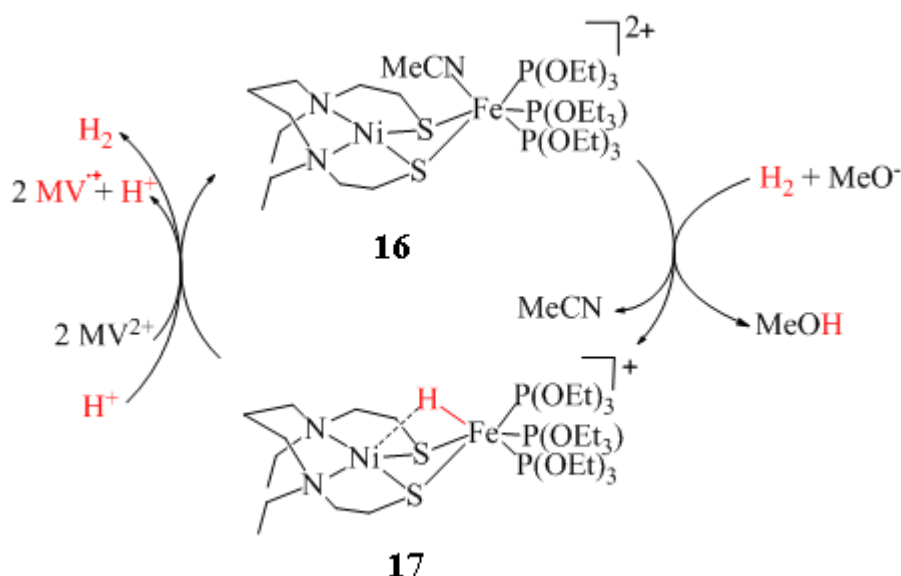


Figure 24. Activation hétérolytique de H_2 (0.1 MPa) par le complexe (16) dans MeCN/MeOH + MeONa pour former l'hydrure (17) correspondant. Réduction de l'hydrure (17) par transfert de l'hydrure à H^+ ou d'électrons à MV^{2+} .

La présence de ligands triéthoxyphosphine sur le fer permet de modifier ses propriétés redox et d'activer l'hydrogène. Il y a formation d'un hydrure caractérisé par structure RX que l'on peut soit protoner (et libérer H_2) soit oxyder par réduction par exemple du méthylviologène (MV). Même si ce système ne fait qu'un cycle catalytique en oxydation, il s'agit du premier exemple de complexe dinucléaire NiFe actif, comme les hydrogénases, en oxydation et en réduction et dans ce sens il montre bien les progrès constants de la chimie dans ce domaine.

2.3.3. Des modèles biomimétiques aux modèles bio-inspirés

Même s'il reste beaucoup d'efforts à fournir pour égaler l'efficacité des hydrogénases, petit à petit, l'approche biomimétique permet la mise au point de nouveaux catalyseurs pour la production d'hydrogène toujours plus actifs et intéressants. On peut également s'éloigner un peu de la structure des sites actifs et donc de la chimie biomimétique en s'intéressant uniquement aux caractéristiques de réactivité et de stabilité du site actif. Les catalyseurs bio-inspirés qui en résultent copient alors les principes de fonctionnement des enzymes.

On dénombre à l'heure actuelle deux types de catalyseurs bio-inspirés particulièrement actifs pour la production d'hydrogène. Les premiers ont été développés par le groupe de DuBois⁸⁹⁻⁹¹ et s'inspirent de la présence d'une base azotée pendante proche du centre métallique, facilitant la réaction entre l'hydrure coordonné à ce centre métallique et le proton lors de la réaction de formation de l'hydrogène. Il s'agit de complexes mononucléaire bis-diphosphine de Ni(II)

dont la structure générale est représentée figure 25. Les ligands diphosphine sont des dérivés du 1,5-diaza-3,7-diphosphacyclooctane. La conformation des cycles permet un positionnement de la base azotée proche du centre métallique.

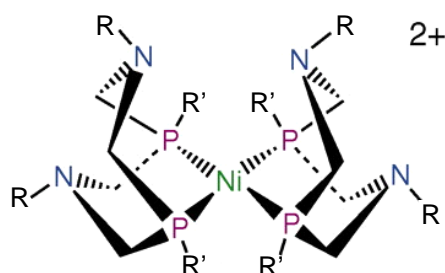


Figure 25. Famille des complexes de nickel(II) avec des ligands de la famille des 1,5-diaza-3,7-diphosphacyclooctanes.

Dans le cas du composé (**18**) pour lequel les ligands diphosphines sont substitués par des groupements phényles, jusqu'à 106 000 cycles catalytiques pour la production d'hydrogène sont effectués par seconde à un potentiel de -1.13V (par rapport au ferrocène) dans l'acétonitrile en présence de 1.2M d'eau.

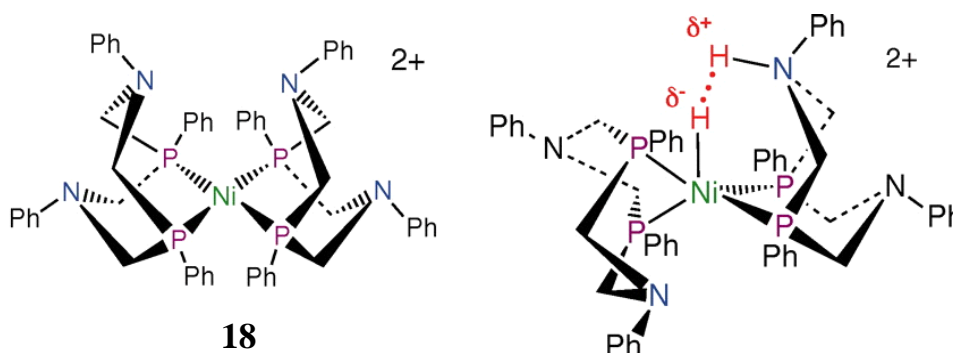


Figure 26. Gauche : Structure du complexe de nickel (**18**) et l'hydrure associé à la protonation d'une amine entraînant la formation de la liaison H-H.

Comme nous allons le voir par la suite la deuxième famille de composés sont des complexes de cobalt permettant de reproduire l'activité d'un centre très nucléophile et de générer des intermédiaires de type hydrure, comme cela se passe au site actif des hydrogénases.

2.4. Des modèles du site actif de la vitamine B12 : les cobaloximes

Dans le cadre de la production d'hydrogène, l'étape clé est la formation d'une liaison hydrogène-hydrogène. Dans les hydrogénases il s'agit d'une formation hétérolytique résultant de l'attaque d'un hydrure sur un proton. Or nous avons à notre disposition dans la banque de

données «Nature» un «super-nucléophile»⁹² qui est la vitamine B12 sous sa forme super-réduite.

2.4.1. La vitamine B12 s : « super-nucléophile » du monde biologique

La vitamine B12 est une coenzyme c'est-à-dire qu'elle se fixe à une enzyme sans cofacteur (apoenzyme) pour former ou compléter le site actif. Les enzymes utilisant la vitamine B12 comme cofacteur ont d'une manière générale une réactivité mettant en jeu un transfert d'atome d'hydrogène par réaction radicalaire.⁹³

La vitamine B12, représentée figure 27, est un complexe de cobalt(III) avec un ligand corrole pouvant exister sous deux autres formes, la vitamine B12 réduite (B12r) et la vitamine B12 super-réduite (B12s).

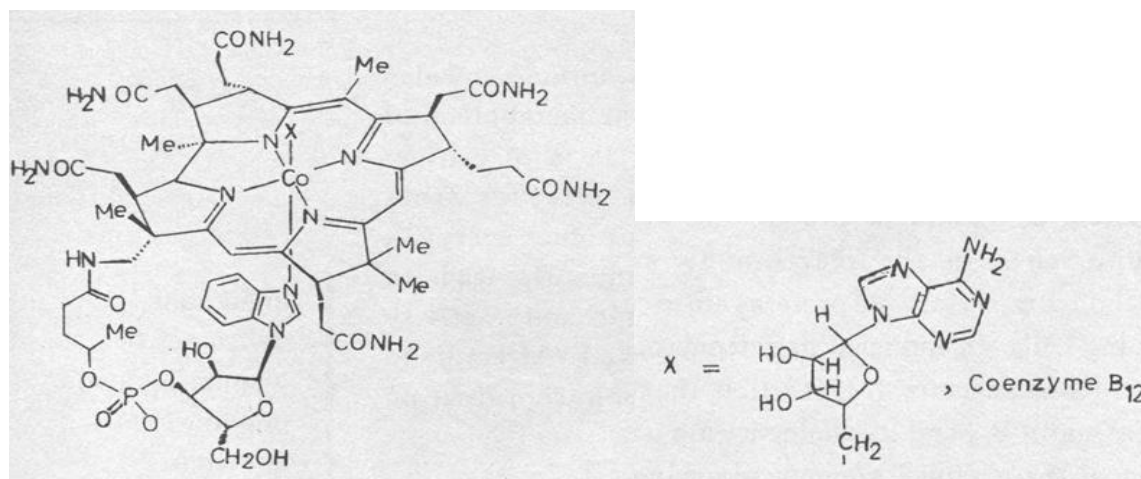


Figure 27. Structure de la vitamine B12.

La vitamine B12r est une cobalamine (II). La vitamine B12s a été identifiée comme un hydrure de Co(III) (résultant de la protonation de la forme Co(I)) par Müller et Müller en 1962⁹⁴ mais en 1965 Schrauzer⁹⁵ a montré que les réactions connues de la vitamine B12s, expliquée par sa structure d'hydrure, étaient en fait dues à la forme Co(I) initialement non protonnée.

2.4.2. Les cobaloximes

Les cobaloximes,⁹⁶ complexes de cobalt pseudomacrocycliques renfermant des ligands dialkylglyoximes, ont été développées comme modèles de la vitamine B12, reproduisant certaines de ses propriétés et en particulier sa grande nucléophilie sous forme super-réduite et la génération de dérivés hydrures de Co(III) appelés hydridocobaloximes.⁹⁷ Il est donc envisageable que l'attaque de l'hydrure de Co(III) sur un proton conduise à la formation d'hydrogène.

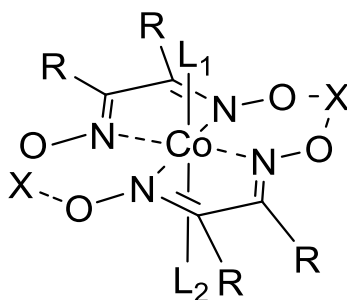


Figure 28. Structure générale des cobaloximes ($[\text{Co}(\text{dmgX})_2\text{L}_1\text{L}_2]$).

Si c'est l'équipe de Lehn qui décrit pour la 1^{ère} fois en 1983⁹⁸ l'utilisation de cobaloximes pour la production d'hydrogène, dans un système photocatalytique utilisant le complexe $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ comme photosensibilisateur, peu d'études ont été réalisées sur ce sujet jusque vers les années 2000.

Notre groupe¹³ a alors décrit pour la première fois les propriétés de la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgH})_2\text{pyCl}]$ comme catalyseur pour la production d'hydrogène. D'autres études ont été menées ensuite sur plusieurs dérivés, les ligands glyoxime permettant en effet une grande diversité structurale puisqu'on peut dériver les atomes pontants entre les deux ligands (X) ainsi que les branches alkyles des glyoximes (R) et les deux ligands axiaux du cobalt (L_1 et L_2).

2.4.3. Relations structure-activité pour la production d'hydrogène catalysée par les cobaloximes

La cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgH})_2\text{pyCl}]$ s'est révélée catalytiquement active mais relativement sensible en présence d'acides forts suite à une hydrolyse des ponts hydrogène dans le plan équatorial. La modification des ponts hydrogène en ponts difluoroboryls a alors permis de diminuer cette sensibilité. En effet la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2\text{L}_2]$ ¹² ($\text{L} = \text{H}_2\text{O}$, CH_3CN ou DMF) se distingue par sa bonne stabilité vis-à-vis de l'hydrolyse et par ses bonnes performances en production d'hydrogène en milieu organique.

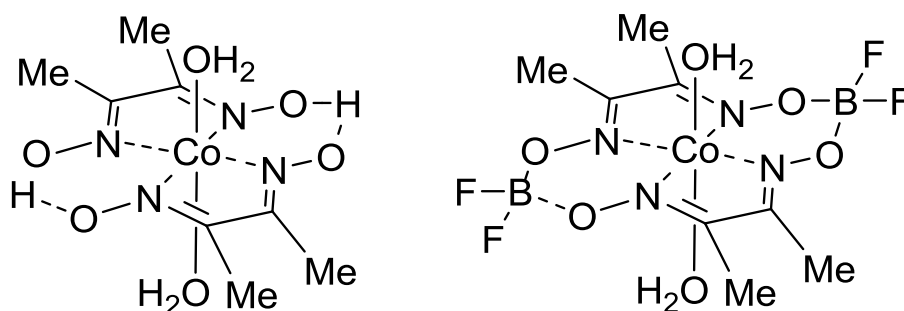


Figure 29. Cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgH})_2\text{L}_2]$ (gauche) et $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2\text{L}_2]$ (droite).

2.4.3.1. Au niveau des potentiels électrochimiques et électrocatalytiques

Le voltammogramme cyclique de $[\text{Co}(\text{dmgH})_2\text{pyCl}]$ dans le DMF présente une vague irréversible correspondant au couple $\text{Co(III)}/\text{Co(II)}$ ($E_{\text{pc}} = -0.61\text{ V}$ vs Ag/AgCl) puis une vague réversible correspondant au couple $\text{Co(II)}/\text{Co(I)}$ ($E = -0.98\text{ V}$ vs Ag/AgCl). Il faut donc appliquer une surtension afin de se placer au moins au potentiel du couple $\text{Co(II)}/\text{Co(I)}$ pour pouvoir observer l'électrocatalyse de production d'hydrogène. Dans ces conditions l'ajout d'acide faible (triéthylamonium dans du 1,2-dichloroéthane) est suffisant pour protoner la cobaloxime et conduire à la production d'hydrogène.¹³ On peut obtenir alors jusqu'à 100 cycles catalytiques en 2.5 heures avant dégradation de la cobaloxime par électrolyse à -0.9 V vs Ag/AgCl en présence de triéthylamine, correspondant à une surtension de 30mV.

La présence de ponts difluoroborates augmente le potentiel électrochimique du couple $\text{Co(II)}/\text{Co(I)}$ ($E = -0.55\text{ V}$ vs Ag/AgCl). Le potentiel minimal nécessaire pour observer une activité catalytique est donc plus faible mais la catalyse nécessite l'utilisation d'un acide plus fort comme cela est expliqué dans la partie 2.4.4 sur les mécanismes de production d'hydrogène. La surtension minimale de production d'hydrogène est ainsi sensiblement similaire. On peut alors obtenir jusqu'à 20 cycles catalytiques en 1h par électrolyse à -0.72 V vs Ag/AgCl en présence d'acide trifluoroacétique.⁹⁹

La modification des groupes alkyl des glyoximes influence également les propriétés électrochimiques des cobaloximes. Le groupe de Hammes-Schiffer a ainsi montré en 2011¹⁰⁰ qu'il existe une dépendance linéaire entre la constante de Hammet de ces groupes et le potentiel électrochimique de la cobaloxime ainsi qu'entre cette constante et le pK_a des couples $\text{HCo(II)}/\text{Co(0)}$ et $\text{HCo(III)}/\text{Co(I)}$.¹⁰¹

2.4.3.2. Au niveau de la stabilité

Comme on a commencé à le voir précédemment, la nature des substituants des cobaloximes a également un effet sur leur stabilité et plus particulièrement face à l'hydrolyse des ponts entre les ligands glyoximes. Ces ponts permettent de former un ligand tetradentate stable autour du cobalt. Après hydrolyse on obtient alors deux ligands bidentates et on observe une decomplexation irréversible du métal.¹⁰²

Ainsi, alors qu'on observe une hydrolyse rapide des ponts H^+ de la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgH})_2\text{pyCl}]$ à $\text{pH} < 5$, cette dernière est plus lente pour $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ renfermant des ponts difluoroborates même si elle reste un facteur limitant pour la stabilité du catalyseur.

Pour aller plus loin et améliorer la stabilité de ces systèmes vis-à-vis de l'hydrolyse acide, notre groupe a été amené à éliminer un des deux ponts entre les fonctions oximes en utilisant un ligand tétradentate diimine-dioxime comme par exemple dans le complexe de cobalt $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$ dont la structure est représentée figure 30.¹¹

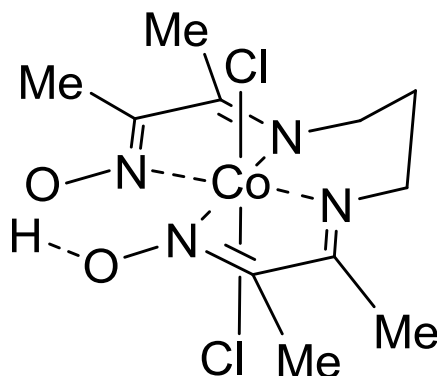


Figure 30. Complexe diimine dioxime de cobalt (III) $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$.

La nature tétradentate du ligand diimine-dioxime apporte une meilleure stabilité au complexe par rapport aux cobaloximes. Ainsi, par exemple, une solution de l'ordre du millimolaire en présence de l'acide fort p-cyanoanilinium tétrafluoroborate dans l'acétonitrile s'est avérée stable sur plusieurs semaines alors que la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$ est, dans les mêmes conditions d'étude, dégradée à 50% au bout de 15h.¹¹

2.4.4. Mécanisme de production d'hydrogène

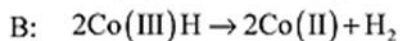
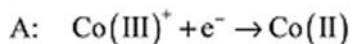
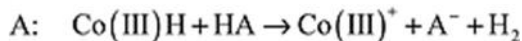
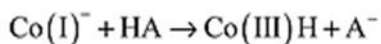
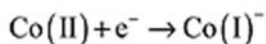
De nombreuses études mécanistiques^{12,99,102,103} ont été réalisées sur la catalyse de la réduction de protons par ces complexes de cobalt et elles ont toutes conclu à la formation d'un hydruure de Co(III) par protonation du Co(I) comme cela a été observé pour la vitamine B12.

Généralement, la formation de la liaison hydrogène-hydrogène provient, ensuite, de l'attaque d'un proton soit directement par l'hydruure de Co(III) soit sur un hydruure de Co(II) préalablement formé par réduction.

Ces deux chemins réactionnels peuvent mettre en jeu un étape de formation d'hydrogène homolytique (mécanismes B) ou hétérolytique (mécanismes A), ces termes désignant la manière dont la liaison métal-hydruure est rompue lors de l'étape de formation de la molécule d'hydrogène.

Les différentes possibilités sont résumées dans la figure 31 ci-dessous : ¹⁰⁴

Chemin 1



Chemin 2

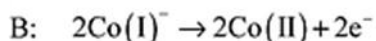
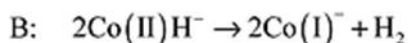
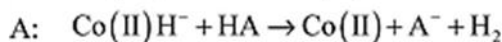
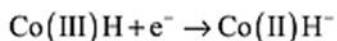
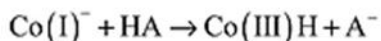
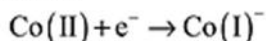


Figure 31. Les différents mécanismes réactionnels possibles pour la formation d'hydrogène catalysée par une cobaloxime.

Les études électrochimiques réalisées au cours de ces 7 dernières années^{12,13,103,105} n'ont pas abouti à un consensus sur le mécanisme catalytique. La difficulté vient du fait que la prédominance d'un mécanisme par rapport aux autres est dépendante des conditions expérimentales mais également qu'il est difficile de différencier de manière certaine les divers intermédiaires Co(I), HCo(III) et HCo(II).

Un point important à noter est que non seulement la concentration relative de l'acide par rapport au catalyseur mais aussi la nature de l'acide peut orienter le système vers différents mécanismes voire influencer la nature homolytique vs hétérolytique du mécanisme. Ainsi en travaillant avec des fortes concentrations d'acide on va favoriser un mécanisme hétérolytique alors que des concentrations faibles vont favoriser un mécanisme homolytique.

Dans ce cadre, les études théoriques récentes^{104,106} ont permis à la fois d'expliquer des données obtenues expérimentalement et également de prédire quel mécanisme va être plus favorable dans des conditions données.

Dans tous les mécanismes, l'étape clé étant la formation d'un hydrure de cobalt par protonation de la cobaloxime, la force de l'acide, utilisé comme source de protons, joue un rôle majeur. Or, le pKa des couples CoH/Co augmente lorsque l'état d'oxydation du cobalt diminue. Un acide fort pourra ainsi protoner un hydrure de Co(III) et il y aura plus favorablement un mécanisme impliquant HCo(III) dans l'étape de formation du dihydrogène. Si l'acide est faible la

formation du dihydrogène se fera par la protonation de l'hydrure de Co(II) provenant de la réduction de HCo(III).

Plus particulièrement en 2011, le groupe de Hammes-Schiffer¹⁰⁴ a calculé les diagrammes d'énergie libre des différents chemins réactionnels possibles avec l'acide paratoluenesulfonique (TsOH) ($pK_a=8$ dans l'acétonitrile) et a donné les clés pour réaliser ce même travail avec d'autres acides plus ou moins forts comme l'acide trifluoroacétique ($pK_a=12,7$ dans l'acétonitrile) ou l'acide tétrafluoroborique ($pK_a=0,1$ dans l'acétonitrile).¹⁰³

Il ressort de cette étude que le mécanisme hétérolytique thermodynamiquement favorable avec l'acide TsOH passe par un hydrure de Co(III) réduit en hydrure de Co(II) qui est protoné pour libérer H_2 (chemin 2A). Les couplages homolytiques de HCo(III) (chemin 1B) ou de HCo(II) (chemin 2B) ne peuvent pas être différenciés thermodynamiquement mais il semblerait que la cinétique privilégie le couplage de deux entités HCo(III), neutres, dont l'approche n'est donc pas gênée par la répulsion électrostatique. Ce dernier point est évidemment hautement dépendant de la nature et de la charge du complexe.

Cependant ces considérations ne sont valables que pour des études en solution. En effet, la catalyse ne peut avoir lieu que via un mécanisme hétérolytique si on immobilise les catalyseurs sur une surface en vue d'un développement technologique (pour faire une électrode modifiée¹⁰⁷) ou encore si on souhaite les encapsuler dans des enveloppes protéiques, comme ce sera le cas dans ce travail de thèse.

D'une manière générale un très grand nombre d'études ont été réalisées dans des solvants inorganiques (acétonitrile dans la majorité des cas) ou dans des mélanges solvant organique/eau. Les électrons sont majoritairement apportés via une électrode ou un couple photosensibilisateur/donneur d'électrons sacrificiel. La source de protons est beaucoup plus variée (eau, acide paratoluenesulfonique, acide trifluoroacétique...).

Cependant seules quelques études catalytiques de complexes de cobalt ont été faites en milieu purement aqueux avec les protons de l'eau comme unique source de protons et le nombre d'étude utilisant des cobaloximes ou des complexes diimine dioxime de cobalt sont encore plus rares.

Bakac et son groupe¹⁰⁸ ont par exemple étudié l'activité catalytique de la cobaloxime $[Co(dmgbF_2)_2Cl_2]$ dans du tampon phosphate à différents pH avec du citrate de titane comme réducteur. Ils rapportent un maximum de 53 cycles catalytiques à pH 1,6 et aucune activité catalytique au-dessus de pH 4.

3. Chimie biosynthétique

3.1. Généralités sur les enzymes artificielles

Nous avons décrit dans la partie précédente une des méthodes développées par les chimistes afin de mettre au point de nouveaux catalyseurs performants en s'inspirant du monde biologique et plus précisément du site actif des enzymes.

Cependant, nous savons que la grande capacité catalytique des enzymes n'est pas uniquement due à leur site actif mais également aux interactions entre ce dernier et l'enveloppe protéique. Les protéines sont en effet d'une manière générale les ligands optimisés par la Nature pour les catalyseurs inorganiques biologiques.

En effet la protéine apporte un contrôle stérique qui diminue les étapes de synthèse en limitant voire éliminant le recours à des groupements protecteurs et augmente la solubilité dans l'eau ce qui permet de travailler en accord avec certains principes de la chimie verte définis par Anastas et Warner en 1998.¹⁰⁹

De plus, les enzymes réalisent souvent un grand nombre de cycles catalytiques en très peu de temps grâce, entre autre, à deux phénomènes. Premièrement, l'enveloppe protéique peut, de par sa structure globale, favoriser l'accès du substrat et limiter les réactions secondaires. Deuxièmement, les interactions entre les acides aminés de la première sphère de coordination et le complexe inorganique apportent une rigidité structurale au site actif et le protègent face à la dégradation.

La seconde sphère de coordination apporte en plus une grande régio-, stéréo- et énantiosélectivité peut, dans certains cas, stabiliser des états de transitions du catalyseur, d'où l'accélération de la cinétique de la réaction catalytique, ou une conformation plus active de ce dernier (états entatiques) et ainsi améliorer la réactivité du système.

Cela est par exemple le cas dans les hydrogénases FeFe comme le montre la figure 32. Dans les modèles les plus simples du site actif des hydrogénases on observe l'existence d'une liaison métal-métal dont la protonation entraîne la formation d'un hydrure pontant. Dans l'hydrogénase, les interactions des ligands cyanures et carboxyles avec les acides aminés de la seconde sphère de coordination via des liaisons hydrogène induisent une rotation d'un des deux centres métalliques ce qui empêche la formation d'une liaison métal-métal et libère un site de coordination sur le fer. La fixation du proton lors de la catalyse entraîne alors la formation d'un hydrure terminal plus réactif.

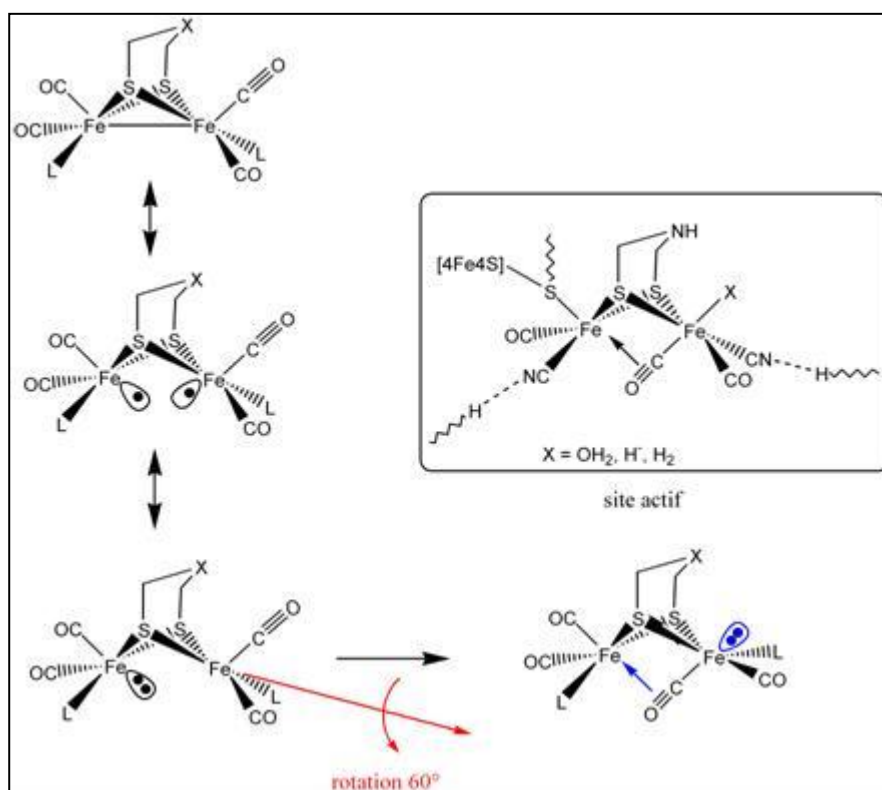


Figure 32. Stabilisation du site actif des hydrogénases FeFe au sein de la structure protéique.

D'un autre côté, les catalyseurs développés en chimie ont également des avantages sérieux puisqu'ils sont faciles à synthétiser et à caractériser. Ils sont aussi stables à la fois à l'état solide et en solution et sont donc moins chers et plus facilement utilisables industriellement.

C'est dans ce contexte que s'est développée une nouvelle chimie, dite chimie biosynthétique, qui tend à combiner les avantages de la chimie de synthèse et de la chimie des protéines au travers de la synthèse d'enzymes artificielles.

Le terme d'enzyme artificielle se doit d'être défini car il n'a pas tout le temps eu la même signification et peut avoir une définition plus ou moins large.

D'un point de vue plus global, les systèmes hybrides utilisant des molécules synthétiques encapsulantes comme les cyclodextrines,¹¹⁰ les calixarènes,^{111,112} ou encore des micelles^{113,114} pour contrôler l'environnement du complexe inorganique à la place de l'enveloppe protéique sont parfois appelés enzymes artificielles.¹¹⁵

D'un point de vue strict, on appellera par la suite enzyme artificielle un composé basé sur une structure de type peptidique. On peut considérer trois sortes d'enzymes artificielles. La première est obtenue en insérant un acide aminé non naturel dans la séquence peptidique d'une protéine naturelle.¹¹⁶ Dans le second groupe l'enveloppe protéique est un polypeptide synthétique n'existant pas dans la nature.¹¹⁷⁻¹¹⁹ La dernière, sur laquelle on se focalisera dans le

paragraphe 3.2, consiste à insérer des catalyseurs inorganiques (cela peut aller d'un simple changement de la nature du métal jusqu'à l'insertion d'un complexe totalement différent) dans des enveloppes protéiques (ou apoenzyme, enzyme dépourvu de son groupement prosthétique). Cette chimie a pu se développer grâce, entre autre, aux progrès faits en biochimie et en biologie moléculaire. On peut en effet maintenant s'appuyer sur des protéines de petites tailles, assez facilement modifiables et produites facilement en grande quantité.

Grâce à des mutations ponctuelles, on peut alors moduler la structure primaire des protéines et ainsi avoir accès à une modification fine de la première et/ou de la deuxième sphère de coordination du catalyseur. On peut alors moduler les forces électrostatiques et l'hydrophobie de l'environnement du complexe inorganique et ainsi moduler ses propriétés physico-chimiques.

3.2. Les différentes voies de formation d'une enzyme artificielle¹²⁰

Il existe 3 méthodes de fixation d'un complexe inorganique non biologique dans une protéine : par liaisons faibles entre les ligands du complexe inorganique et la protéine, par coordination de certains acides aminés directement avec le métal de catalyseur ou enfin par liaison(s) covalente(s) entre les ligands du complexe et certains acides aminés de la protéine.

3.2.1. Par liaisons faibles entre les ligands du complexe inorganique et la protéine

L'élaboration d'enzymes artificielles par cette méthode s'appuie sur l'existence d'interactions fortes entre une zone de l'enveloppe protéique et un motif organique.

Une première méthode de choix est basée sur l'utilisation d'une protéine possédant une affinité particulièrement forte avec son cofacteur (un peu comme un anticorps avec son antigène). On peut alors fonctionnaliser le cofacteur avec le complexe inorganique catalysant la réaction voulue et obtenir ainsi une grande affinité entre la protéine et ce catalyseur. Le couple de choix pour cette approche est constitué de la biotine associée à l'avidine ou à la streptavidine, les protéines étant très similaires. En effet la constante d'affinité entre ces deux partenaires est de 10^{14} M^{-1} et elle n'est que relativement affectée par la modification de la chaîne carbonée de la biotine.

Un grand nombre de complexes inorganiques ont été insérés, via un couplage avec la biotine, dans une structure protéique pour catalyser des réactions, de manière énantiosélectives, la protéine jouant le rôle d'inducteur de chiralité.

Le principe est représenté dans la figure ci-dessous :

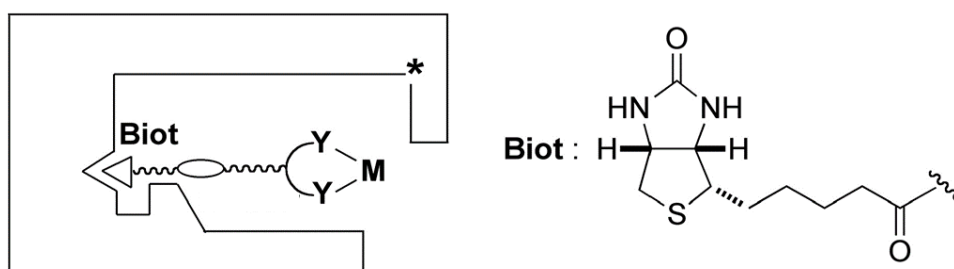


Figure 33. Schéma d'une enzyme artificielle basée sur l'interaction entre la streptavidine et la biotine. * : chiralité de l'enveloppe protéique pouvant jouer le rôle d'inducteur de chiralité.

L'équipe de Ward a développé cette méthode pour réaliser différentes réactions suivant la nature du complexe inséré. Ils ont ainsi décrit des enzymes artificielles à base de complexes de ruthénium et de streptavidine, actives pour l'hydrogénation énantiosélective de cétones aromatiques¹²¹⁻¹²⁴ ou encore, selon la nature du complexe de ruthénium, pour la métathèse d'oléfine.¹²⁵ Dans le cas de l'hydrogénation énantiosélective de cétone, l'hydrogénation se fait par transfert d'hydrure. Ils ont été amenés à tester un grand nombre de complexes de ruthénium différents dont la structure générale est représentée figure 34.¹²²⁻¹²⁴ Dans tous les cas la sphère de coordination du ruthénium est composée d'un ligand biotinylé coordonné au ruthénium par deux amines, d'un ligand de type arène (p-cymène ou benzène par exemple) et d'un ligand labile de type chlorure permettant la fixation d'un ligand hydrure au cours du cycle catalytique.

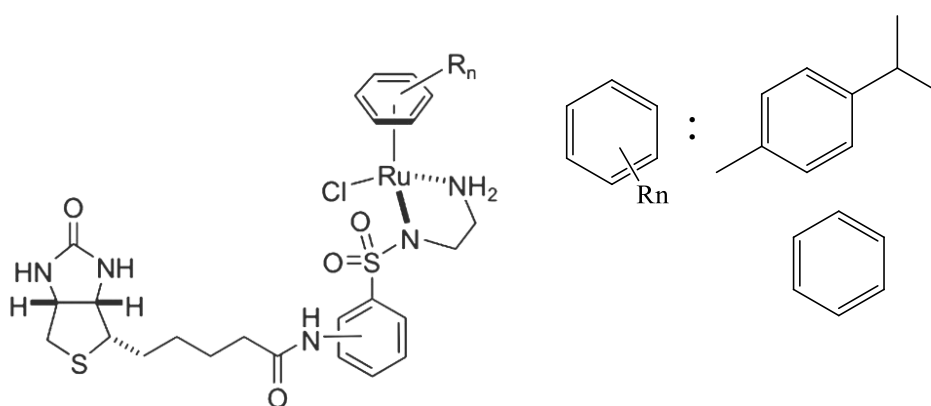


Figure 34. Structure des complexes de ruthénium couplés via une liaison amide à la biotine. La sphère de coordination du ruthénium est composée du ligand diamine biotinylé ainsi que d'un ligand arène et d'un ligand chlorure.

Un grand nombre d'études ont été faites sur ces hybrides avec différentes mutations et différents complexes inorganiques.

Ils ont par exemple étudié l'hydrogénation énantiosélective de deux cétones aromatiques : *p*-methylacetophenone (**19**) et α -tetralone (**20**) (représentées figure 35) par différents hybrides.

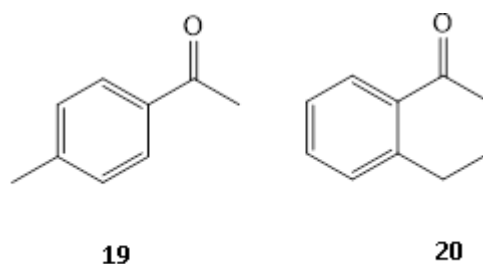


Figure 35. Structures des cétones aromatiques *p*-methylacetophenone (**19**) et α -tetralone (**20**).

Sur la base d'une étude cristallographique¹²⁴ ils ont pu observer que la boucle comprenant les acides aminés 112 à 121 ainsi que la proline 64 et la leucine 124 est relativement proche du site actif. Des mutations dans cette région ont permis d'augmenter à la fois le taux de conversion et l'excès énantiomérique de la réaction par rapport à l'utilisation de la protéine sauvage comme enveloppe. On peut noter par exemple dans le cas de l' α -tetralone (**20**) que l'utilisation du double mutant S112G-P64G par rapport à la protéine sauvage permet d'augmenter l'excès énantiomérique de 86% à 95% et le taux de conversion de 48% à 99%.

De manière assez similaire il est possible de fixer un cofacteur non naturel en reproduisant la structure du cofacteur naturel de manière suffisamment fine pour obtenir une grande affinité entre ce dernier et l'enveloppe protéique. Ainsi, Michèle Salmain¹²⁶ et ses collaborateurs ont également réalisé l'hydrogénation énantiosélective de cétone à partir d'enzymes artificielles basées sur cette propriété. Ils ont pour cela utilisé la grande affinité de la protéine β -lactoglobuline avec les acides gras. La chaîne aliphatique occupe la cavité hydrophobe de la protéine alors que la fonction carboxyle est orientée vers l'entrée calyx de la protéine (formant huit feuillets bêta antiparallèles structurés en tonneau).

Les complexes de ruthénium et de rhodium dont la sphère de coordination est constituée de deux ligands azotés, d'un ligand de type arène et d'un ligand chlorure sont actifs pour l'hydrogénation de cétones comme on l'a vu précédemment (figure 34). La réaction d'un acide gras avec deux 2-aminopyridine conduit à la formation d'un ligand diamine du ruthénium ou du cobalt portant une longue chaîne carbonée pouvant interagir avec la cavité de la β -lactoglobuline (figure 36).

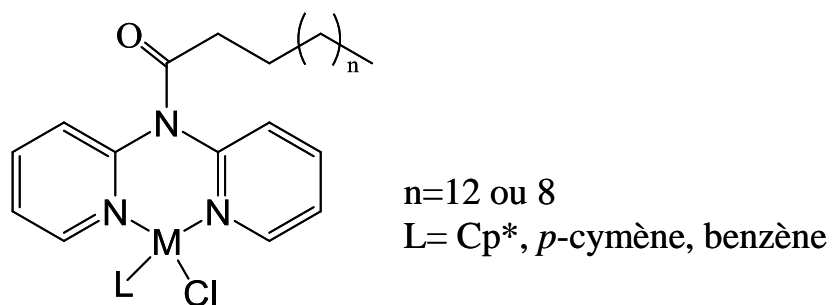


Figure 36. Structure des complexes de rhodium et ruthénium actif pour l'hydrogénation de cétones aromatiques.

La présence de la protéine sert d'inducteur de chiralité et permet d'obtenir des excès énantiomérique non nuls pouvant aller pour la réaction d'hydrogénation de la trifluoroacétophénone jusqu'à 26% pour le complexe de rhodium en présence du pentaméthylcyclopentadiényle (Cp^*) comme groupement aromatique.

Stéphane Ménage et ses collaborateurs ont aussi pu insérer dans la protéine de transport de nickel NikA d'*E.Coli* des complexes de fer de structure très similaire au métallophore naturel de la protéine. Une étude cristallographique a permis d'identifier jusqu'à 72 interactions non covalentes entre le ligand du fer et l'enveloppe de la protéine.¹²⁷

On trouve également dans la littérature des enzymes artificielles basées sur des interactions non covalentes entre un complexe inorganique et une protéine ne possédant naturellement pas de cofacteur. Ces protéines possèdent généralement une zone d'interaction particulière permettant l'incorporation et la fixation d'un cofacteur. On peut dans ce cadre prendre l'exemple des xylanases. Ces protéines sont impliquées dans l'hydrolyse du polysaccharide β -1,4-xylane en xylose. Certaines protéines de cette famille possèdent un site catalytique de fixation du xylane fortement cationique et il a été montré qu'elles peuvent de ce fait fixer des complexes inorganiques possédant des groupements chargés négativement comme par exemple les groupements carboxylates.¹²⁸ Le groupe de Jean-Pierre Mahy a ainsi préparé et caractérisé des enzymes artificielles avec différentes xylanases et différents complexes chargés négativement. La nature du complexe oriente l'activité chimique de l'enzyme artificielle. La xylanase A de *Streptomyces lividans* a ainsi montré une bonne affinité avec des complexes de manganèse catalysant ainsi l'époxydation énantiosélective de dérivés du styrène.¹²⁹ Les ligands du manganèse sont soit un ligand porphyrine soit un ligand salen portant tous les deux des groupements carboxylates. Leurs structures sont représentées figure 37.

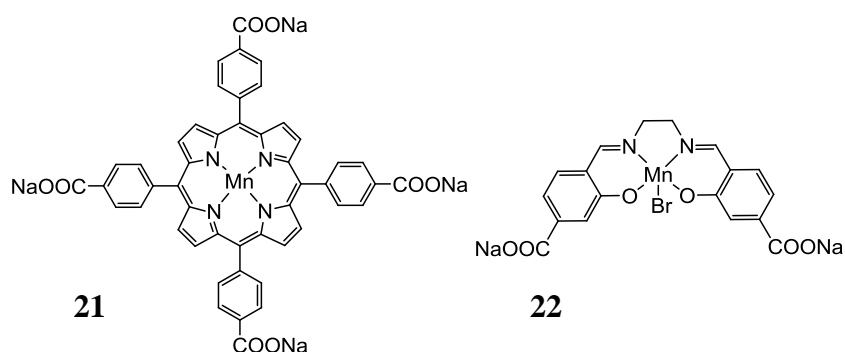


Figure 37. A gauche : Structure de la porphyrine de manganèse substituée par des groupements carboxylates (**21**). A droite : Structure du complexe salen de manganèse substitué par des groupements carboxylates (**22**).

Dans les deux cas aucune liaison entre un acide aminé et le manganèse n'est formée. Les ligands forment des liaisons faibles avec différents acides aminés de la cavité de la xylanase permettant d'obtenir des constantes de dissociation de l'ordre du μM . Ces constantes sont de ce fait fortement dépendantes de la structure du complexe. La xylanase associée au complexe (**21**) (**21**-xylanase) a ainsi une constante d'affinité de $1.5 \mu\text{M}$ alors qu'associée au complexe (**22**) (**22**-xylanase) cette constante d'affinité augmente à $31 \mu\text{M}$. Des études de docking permettent d'identifier les différentes interactions mises en jeu. Ces affinités sont suffisantes pour que, comme dans le cas des études d'hydrogénation énantiosélective présentées plus haut (avec la streptavidine ou la β -lactoglobuline), la protéine serve d'inducteur de chiralité : Les excès énantiomériques peuvent aller jusqu'à 80% pour l'époxydation énantiosélective du p-methoxystyrène avec l'hybride **21**-xylanase.

La nature des ligands ainsi que la nature de l'ion métallique central permet de moduler les interactions entre les acides aminés de la protéine et le complexe inorganique. Jean-Pierre Mahy et ses collaborateurs¹³⁰ ont ainsi pu montrer que la disposition en ortho ou para du groupe carboxylique de l'acide benzoïque, substituant la porphyrine de fer permet ou non la formation d'une liaison supplémentaire entre le fer et un acide aminé de la protéine.

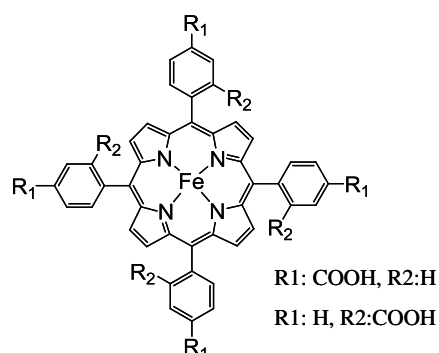


Figure 38. Structure de la famille de porphyrine de fer insérée dans la xylanase.

3.2.2. Par la coordination de certains acides aminés avec le métal du catalyseur

La coordination spécifique d'un acide aminé à l'ion métallique d'un complexe inorganique, sans mettre en œuvre d'autres interactions faibles particulières est la deuxième voie de synthèse d'enzymes artificielles. Cette méthode permet une plus grande variabilité des ligands du métal. Dans ce cas on utilise la capacité de certains acides aminés à pouvoir jouer le rôle de ligand d'un centre métallique (comme par exemple les histidines). Les protéines utilisées sont souvent des protéines possédant un cofacteur naturel métallique. Le plus simple consiste alors à remplacer l'ion métallique naturel par un autre. On peut prendre comme exemple les travaux effectués sur une hémoprotéine de transfert de l'oxygène fixant biologiquement une protoporphyrine IX de fer : la myoglobine. Différents groupes ont ainsi pu coordiner dans la poche protéine de la myoglobine des protoporphyrine IX de ruthénium,¹³¹ de manganèse¹³² ou encore de gallium.¹³³ Ces différentes protéines artificielles ont montré des propriétés intéressantes issues de la modification du métal. L'insertion d'une protoporphyrine IX de gallium permet ainsi d'avoir accès à des techniques spectroscopiques non exploitables lorsque le cofacteur Fe(III) haut spin est présent au sein de la protéine.¹³³

On peut également modifier la nature du ligand. Watanabe et Ueno ont par exemple étudié l'insertion de complexes plans (ligands salen ou salophen, de chrome ou de manganèse représentés figure 39) dans l'apo-myoglobine.¹³⁴

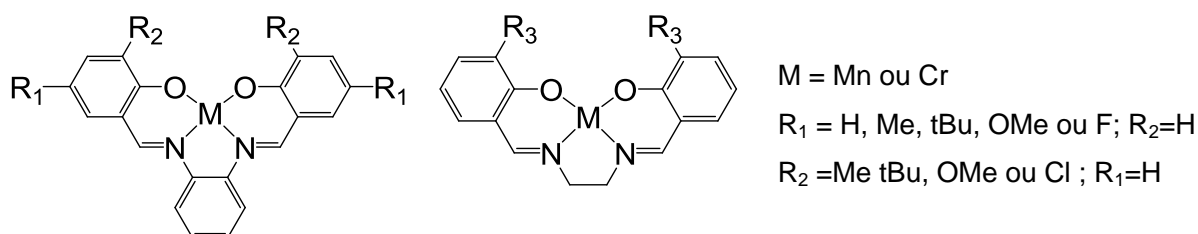


Figure 39. Structure des différents complexes incorporés dans la myoglobine dans cette étude. A gauche : famille des ligands salophen, à droite : famille des ligands salen.

Le complexe en se coordonnant à l'histidine 93 de la cavité protéique se retrouve dans un environnement chiral comme cela a été confirmé par l'analyse de la structure cristallographique de l'hybride formé entre le mutant A71G de la myoglobine et un complexe de manganèse coordonné à un dérivé salophen, portant un groupement méthyl en ortho de l'oxygène (R₁ = Me; R₂ = H à gauche sur la figure 39).

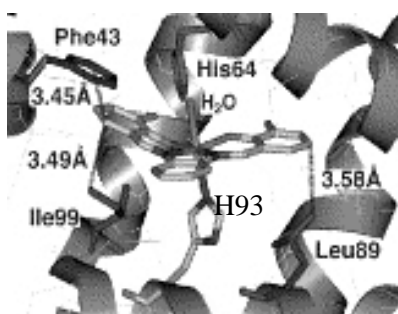


Figure 40. Structure du complexe de manganèse (R_1 -Me)salophen incorporé dans le mutant A71G de la myoglobine. On observe la coordination de l'histidine 93 au manganèse.

On obtient ainsi une enzyme artificielle capable de catalyser de manière énantiosélective la sulfoxydation du thioanisole. Comme on l'a vu précédemment avec les travaux de Ward sur la streptavidine, la mutation de certains acides aminés de la poche protéique permet d'augmenter les excès énantiomériques des réactions. Ils obtiennent ainsi jusqu'à 33% d'excès énantiomérique en insérant dans le double mutant de la myoglobine H64D/A71G un complexe de chrome associé à un ligand salen substitué par deux méthyls en ortho de l'oxygène (position R_3 à droite figure 39).

Notre groupe¹⁰ a également appliqué cette méthode pour insérer le complexe de manganèse $\{Mn(CO)_3(H_2O)_2\}^+$ dans le lysozyme de blanc d'œuf via la coordination de l'histidine 15 au manganèse comme cela a été confirmé par étude de la structure cristallographique de l'hybride représentée figure 41.

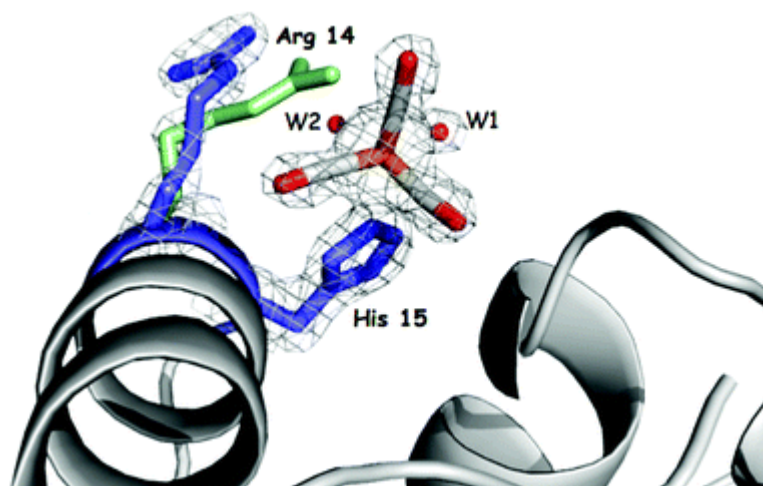


Figure 41. Structure cristallographique de l'hybride lysozyme- $[Mn(CO)_3(OH_2)_2]$ avec les densités électroniques autour du manganèse, des carbonyles, de l'histidine 15, Arginine 14 et les ligands aqueux. L'arginine 14 représentée en vert correspond à sa position en absence de complexe de manganèse.

La réaction de cet hybride avec des complexes de nickel a abouti à la formation d'un complexe dinucléaire nickel-manganèse comme représenté figure 42 pour le complexe de nickel $[\text{Ni}(\text{xbsms})]$ (H_2xbsms =1,2-bis(4-mercapto-3,3-diméthyl-2-thiabutyl)benzene).

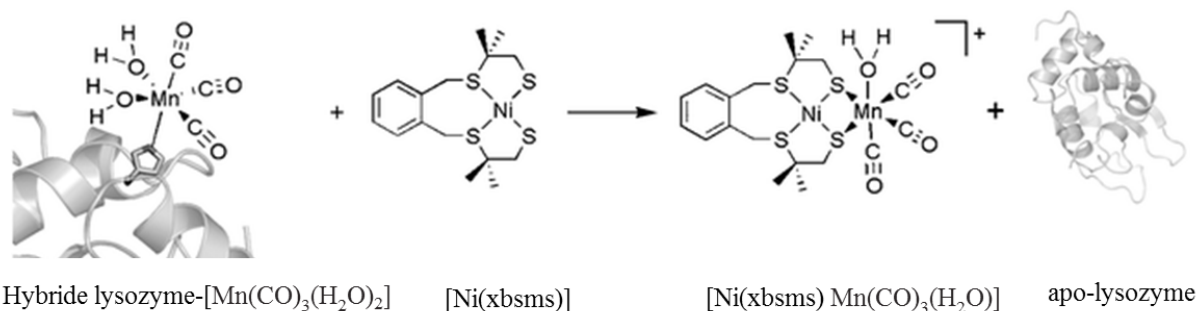


Figure 42. Réaction de l'hybride lysozyme- $[\text{Mn}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_2]$ avec le complexe de nickel $[\text{Ni}(\text{xbsms})]$.

3.2.3. Par liaison covalente avec un ou des acides aminés de la protéine

Afin d'éviter un équilibre de dissociation entre la protéine hôte et le complexe il est parfois souhaitable de les coupler via une liaison covalente. Il existe plusieurs protocoles pour modifier différents acides aminés naturels et pour les faire réagir avec des composés chimiques,¹³⁵ cependant la majorité des exemples présents dans la littérature utilise la réactivité du thiol des cystéines afin de créer une liaison covalente avec le complexe.

L'équipe de Lu¹³⁶ a par exemple appliqué cette méthode à la famille de complexes présentés ci-dessus avec la même protéine (les complexes de $\text{Mn}(\text{salen})$ avec la myoglobine) pour la sulfoxydation du thioanisole. Deux groupements methanethiosulfonates ont par exemple été ajoutés au ligand salen afin de permettre une liaison entre ce dernier et un ou deux thiols par substitution et formation de ponts disulfure entre le complexe (**23** dont la structure est représentée figure 43) et la protéine.

L'excès énantiomérique de la réaction catalysée augmente lorsqu'on augmente les points d'attaches entre le complexe (**23**) et la protéine. On passe alors de 0% d'excès énantiomérique lorsque le complexe n'est fixé que via la coordination à l'histidine 93, à 12% lorsqu'il y a un seul point d'attache et enfin 51% avec deux points d'attaches. Dans ce cas les liaisons covalentes permettent de stabiliser l'orientation du complexe dans la poche protéique ce qui améliore l'excès énantiomérique.

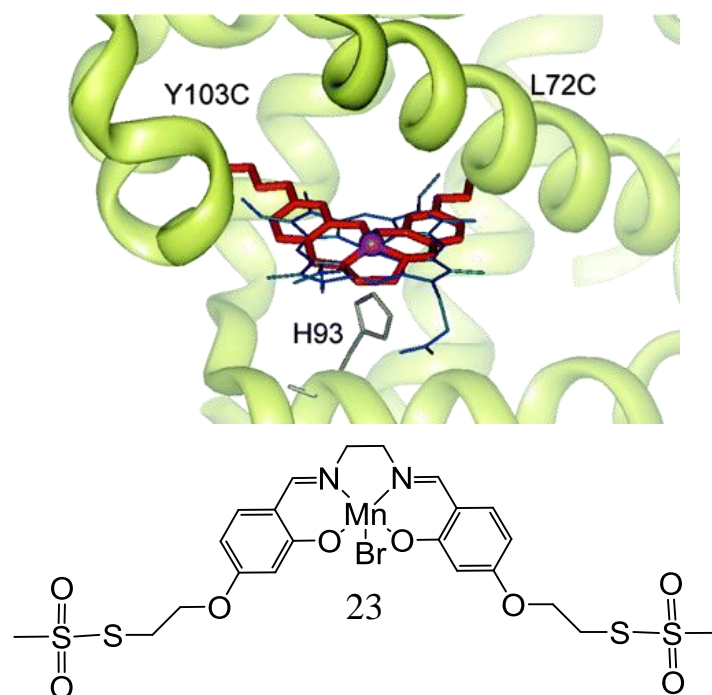


Figure 43. Haut : Simulation de l'insertion du complexe dans le mutant Mb(L72C/Y103C). Bas : Complexe de Mn(salen) modifié afin de pouvoir s'attacher covalamment à deux cystéines (18).

Les liaisons covalentes peuvent également permettre de fixer des complexes inorganiques dans des enveloppes protéiques n'ayant pas d'affinité l'un pour l'autre.

Michèle Salmain et ses collaborateurs ont par exemple appliqué cette méthode pour insérer des complexes de métaux de transition dans une protéase à cystéine : la papaine de *Carica papaya*.¹³⁷⁻¹⁴⁰ Cette protéine possède une unique cystéine en position 25 pouvant réagir par son thiols avec différents groupes partants comme par exemple les groupes chloroacétamide ou maleimide.¹³⁷ Les complexes de ruthénium et de rhodium décrits plus haut ont été couplés à la papaine par cette technique. Ces nouvelles enzymes artificielles ont également des activités catalytiques pour l'hydrogénation énantiosélective de cétones aromatiques. Ils ont pu alors obtenir une conversion quantitative de la trifluoroacétophénone dans le cas de l'hybride avec les deux complexes de rhodium en présence du pentaméthylcyclopentadiényle (Cp^{*}) comme ligand aromatique.¹⁴⁰ Comme on l'a vu précédemment un taux de conversion de 26% avait été obtenu pour le même substrat avec ce même complexe fonctionnalisé pour interagir avec la β -lactoglobuline.

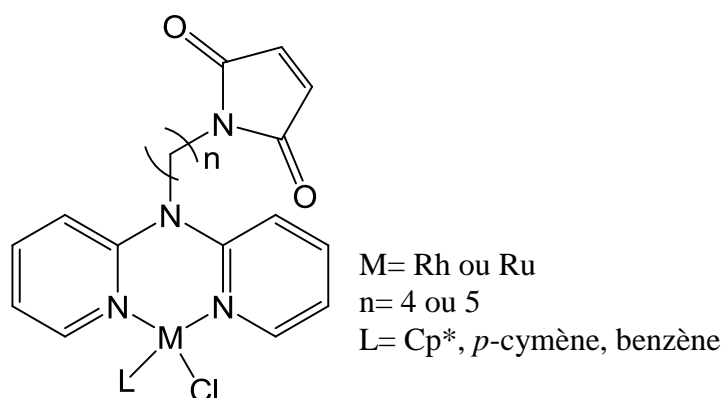


Figure 44. Structure de la famille de complexe de rhodium et de ruthénium inséré dans la papaine.

Hayashi¹⁴¹ a utilisé la même stratégie pour fixer un complexe dinucléaire de fer à un cytochrome c (le cytochrome c de cœur de cheval) en tirant parti des deux thiols fixant biologiquement l'hème via des liaisons thioethers (la structure cristallographique du cytochrome c₅₅₆ est représentée figure 48).

Grâce aux deux soufres des cystéines on forme, par réaction avec $[\text{Fe}_2(\text{CO})_9]$, un complexe dinucléaire de fer bis-thiolatoponté, biomimétique du site actif de l'hydrogénase FeFe. Comme on le verra ci-dessous dans la partie 3.3 sur les hydrogénases artificielles, l'hybride obtenu catalyse la production d'hydrogène à partir des protons de l'eau.

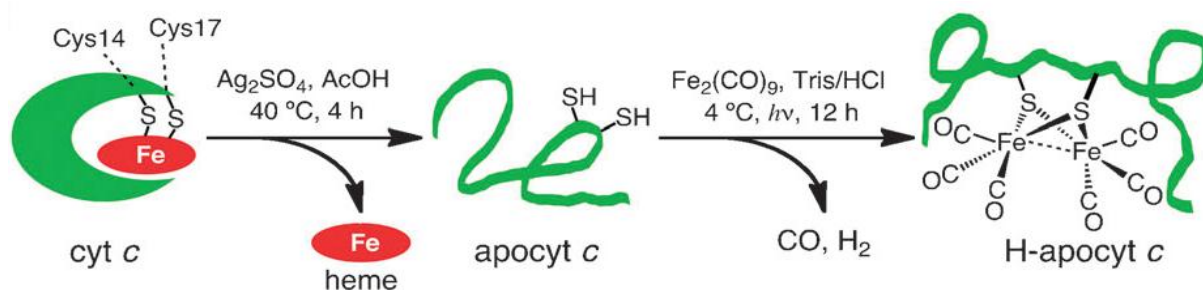


Figure 45. Protocole de préparation de l'hybride entre le cytochrome c de cœur de cheval et $\text{Fe}_2(\text{CO})_9$.

3.3. Les hydrogénases artificielles

Il existe peu d'exemples d'enzymes artificielles ayant pour fonction de produire de l'hydrogène à partir de protons de l'eau et qu'on peut donc appeler par analogie hydrogénases artificielles. Dans ce cadre, un des premiers exemples est rapporté par le groupe d'Anne K. Jones.¹⁴² Ils ont alors fait réagir le complexe $[\text{Fe}_3(\text{CO})_{12}]$ avec un peptide synthétique possédant deux résidus thiols conduisant, comme avec le cytochrome c de cœur de cheval, à la formation d'un complexe dinucléaire de fer bis-thiolatoponté, biomimétique du site actif de l'hydrogénase FeFe. Cependant aucune activité hydrogénase n'est rapportée.

Chapitre I – Bibliographie

Dans la même idée le groupe de Ghirlanda¹¹⁹ a préparé une hydrogénase artificielle en utilisant comme enveloppe protéique un peptide hélicoïdal de 19 acides aminés. Ce dernier est riche en résidus alanine et possède également un acide aminé non naturel, une leucine modifiée possédant deux thiols terminaux (Dt : Leu-(SH)₂).

YGGKAAAKAAAAKADtAAK

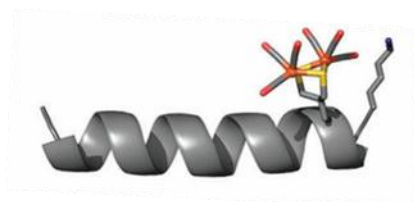


Figure 46. Haut : séquence polypeptidique du polypeptide synthétique. Bas : représentation du polypeptide synthétique incorporant le catalyseur.

Le précurseur du catalyseur est le même complexe trinucléaire de fer que précédemment : [Fe₃(CO)₁₂]. Il réagit alors avec les deux thiols terminaux du résidu dithio-leucine pour former le complexe [(Fe(CO)₃)₂(peptide-CH(CH₂S)₂)]. La structure hélicoïdale du peptide initialement perturbée par l'insertion de l'acide aminé non naturel est ensuite stabilisée par la présence du complexe. Cet hybride possède une activité photocatalytique de production d'hydrogène en milieux aqueux tamponné à pH 4.5 en présence du complexe de ruthénium [Ru(bipy)₃]²⁺ comme photosensibilisateur et de l'ascorbate comme donneur d'électrons sacrificiel (voir chapitre IV). Il réalise jusqu'à 80 cycles catalytiques.

Les hydrogénases artificielles sont majoritairement formées à partir de peptides synthétiques et il existe un seul exemple dans la littérature basé sur des protéines. L'exemple développé par le groupe d'Hayashi^{141,143} à partir du cytochrome c en est un bon exemple.

Comme on l'a vu précédemment, un cytochrome c a été utilisé comme protéine hôte d'un complexe dinucléaire de fer afin de créer in-situ par réaction avec deux cystéines un complexe biomimétique des hydrogénases FeFe.

L'activité de production d'hydrogène de cet hybride a été évaluée dans des conditions photocatalytiques en le combinant avec un complexe de ruthénium ([Ru(bipy)₃]²⁺) comme photosensibilisateur et avec l'ascorbate comme donneur d'électrons sacrificiel suivant un schéma catalytique décrit en figure 47.¹⁴¹

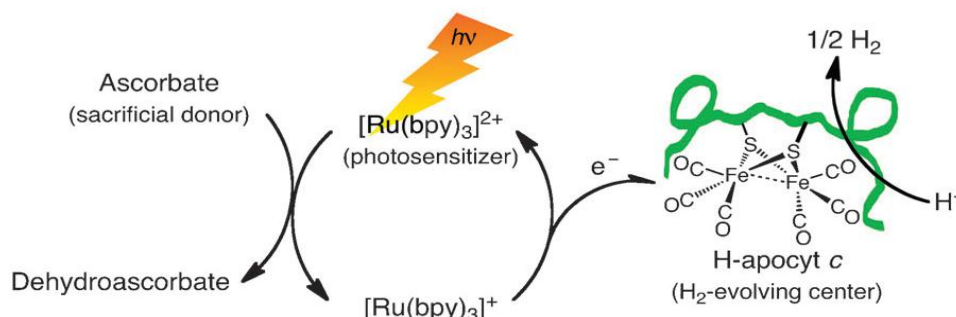


Figure 47. Cycle catalytique proposé pour la photoproduction d'hydrogène à partir de protons par l'hybride H-apocyt c en milieu aqueux.

L'hybride a montré une activité catalytique, dans les conditions photocatalytiques identiques à celles utilisées par Guirlanda, allant jusqu'à 82 cycles catalytiques à pH 4.7. Cependant à pH neutre (pH=7.4) l'activité catalytique diminue drastiquement puisqu'on obtient alors 5.6 cycles catalytiques. Cette étude montre de plus l'influence de l'enveloppe peptidique sur l'activité catalytique puisque à pH 4.7 l'activité catalytique est divisée par 8 quand on utilise un peptide de 8 acides aminés ne reproduisant que l'environnement immédiat des deux cystéines de fixation à la place de l'apo-cytochrome c complet.

Afin de préparer une enzyme artificielle possédant à la fois le complexe et le photosensibilisateur,¹⁴³ cette même équipe s'est inspirée d'un autre type de cytochrome c, le cytochrome c₅₅₆, qui possède une séquence caractéristique CXXCH (figure 48). Un peptide de 18 acides aminés reproduisant une partie de la séquence polypeptidique du cytochrome c₅₅₆ autour du motif caractéristique CXXCH a été utilisé.

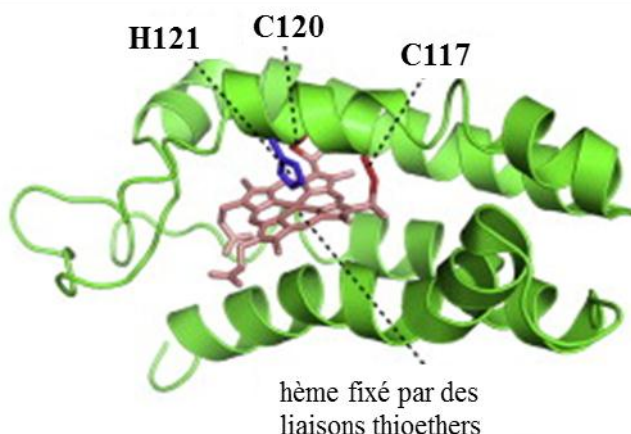


Figure 48. Structure du cyt c₅₅₆ obtenue à partir de la banque de donnée des protéines. (Code PDB : 1S05)

Le complexe de ruthénium [Ru(bpy)(tpy)(H₂O)]²⁺ a été choisi comme photosensibilisateur. Il se coordonne à l'histidine par échange avec l'eau, labile, tandis que les deux cystéines

réagissent comme précédemment avec $[\text{Fe}_2(\text{CO})_9]$ pour former in situ le complexe dinucléaire de fer bithiolatoponté. Le protocole de préparation ainsi que la structure sont schématisés figure 49.

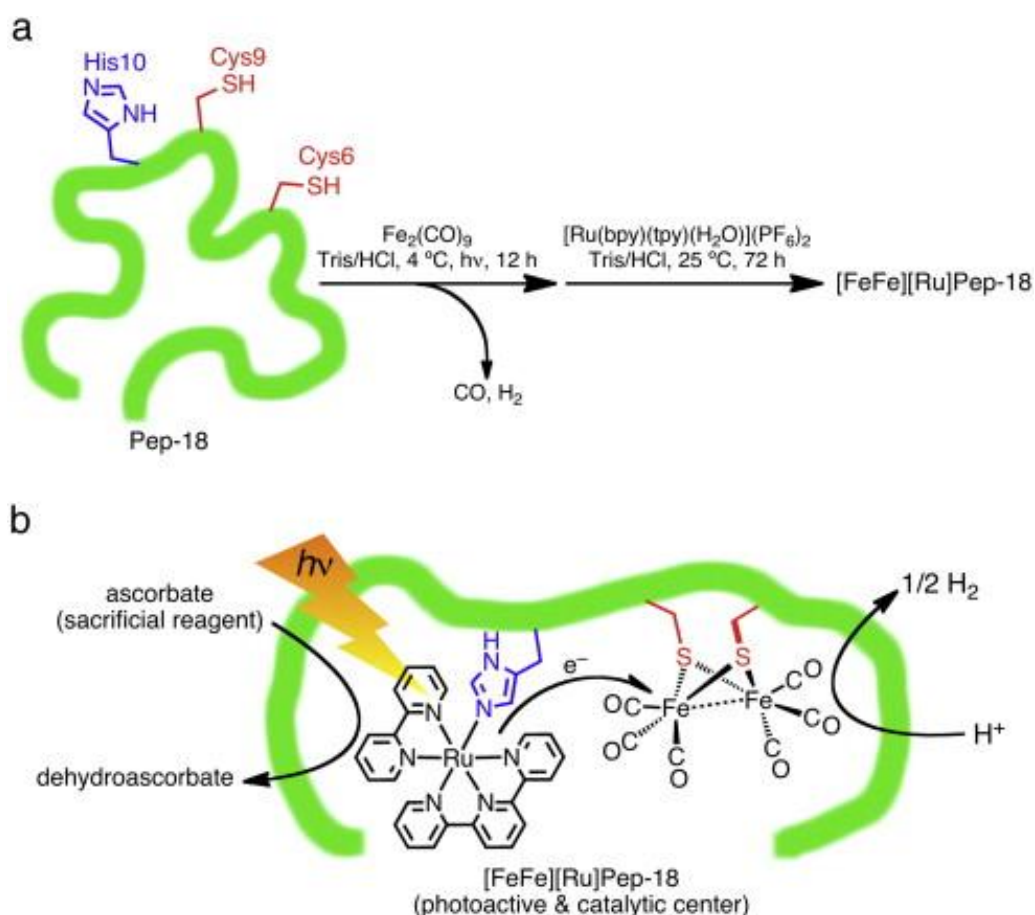


Figure 49. a. synthèse du segment C terminal du cyt c_{556} contenant le cluster $[\text{Fe}_2(\text{CO})_6]$ et le photosensibilisateur $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{tpy})(\text{Im})]^{2+}$. b. Cycle catalytique proposé pour la photoproduction d'hydrogène à partir de protons par l'hybride $[\text{FeFe}][\text{Ru}]\text{Pep-18}$ en milieu aqueux.

Cette hydrogénase artificielle catalyse la production d'hydrogène à partir d'eau et effectue jusqu'à environ 9 cycles catalytiques à pH légèrement basique (pH= 8.5).

3.4. La myoglobine : protéine hôte de choix

Ainsi, l'essentiel des hydrogénases artificielles développées jusqu'à présent s'appuie sur l'utilisation de petits peptides comme ligands de modèles biomimétiques du site actif des hydrogénases FeFe ou NiFe. A côté de ces peptides synthétiques, les hémoprotéines comme le cytochrome c (avec l'exemple issu du groupe d'Hayashi) sont des protéines de choix pour la construction de systèmes hybrides.

Nous allons maintenant concentrer notre étude sur la myoglobine. Il s'agit d'une des protéines les plus étudiées et donc les mieux caractérisées ce qui explique qu'elle soit particulièrement

utilisée comme protéine hôte de différents complexes pour la mise au point d'enzymes artificielles pour la catalyse d'oxydation de substrats organiques. C'est pour ces mêmes raisons que nous allons l'exploiter dans la suite de ce travail. Elle a été la première métalloprotéine dont la structure a été résolue en 1958¹⁴⁴ par le groupe de John Cowdery Kendrew, ce qui lui valut le prix Nobel de chimie en 1962 avec Max Ferdinand Perutz, et depuis on dénombre des centaines de structures de myoglobine native, de variants ou d'hybrides.

La myoglobine est une protéine globulaire de petite taille possédant une cavité hydrophobe dont la structure cristallographique est représentée figure 50. Elle fait partie du groupe des hémoprotéines. Les protéines de ce groupe ont des rôles biologiques très variés. On trouve la myoglobine chez les vertébrés où elle assure un rôle de transport de l'oxygène entre le sang et les cellules musculaires. Son cofacteur naturel est une porphyrine de fer coordonné à la protéine via un résidu histidine (His93 ou histidine proximale). Un deuxième résidu histidine (His64 ou histidine distale) présent dans la poche hydrophobe enveloppant le complexe joue un rôle majeur dans l'activité biologique de la myoglobine. En effet, elle facilite d'une part la coordination de l'oxygène moléculaire sur le fer de la porphyrine (figure 51) en formant une liaison hydrogène avec l'oxygène. D'autre part cette histidine limite, par gêne stérique, la coordination d'autres gaz compétiteurs et nocifs (comme par exemple le monoxyde de carbone) et empêche également, en imposant une conformation coudée du dioxygène coordonné, la formation d'espèce fer-oxo ou fer-peroxo.

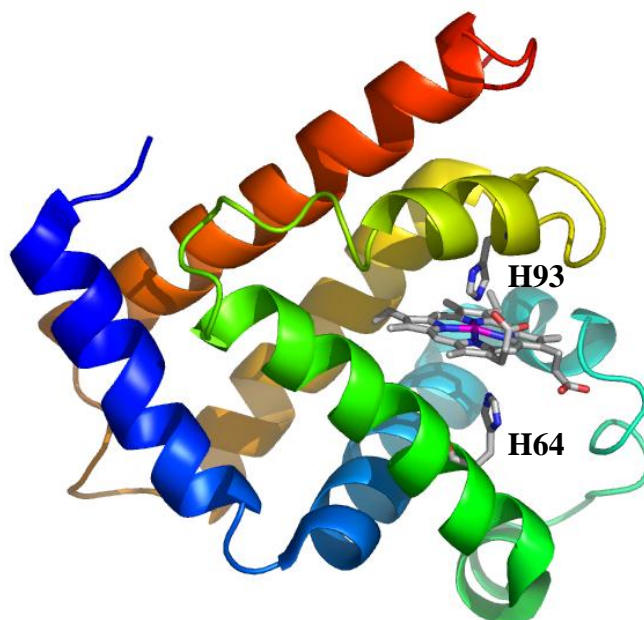


Figure 50. Structure de l' holo-myoglobine de cachalot avec la représentation des deux histidines disponibles dans la poche hydrophobe.

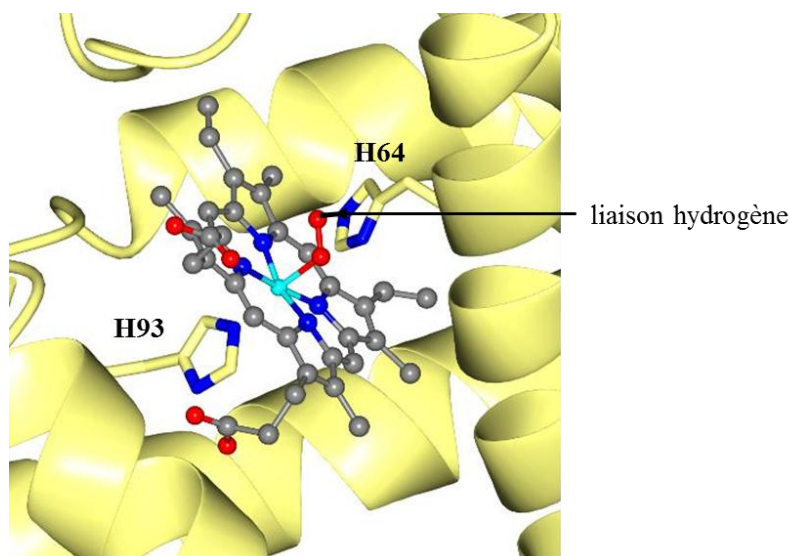


Figure 51. Structure du site actif de l'holo-myoglobine avec l'hème coordonné à l'histidine 93, le dioxygène coordonné au fer et établissant une liaison hydrogène avec l'histidine 64.

D'une manière générale, des mutations stratégiques sur des acides aminés proches du site actif modifient l'activité de la myoglobine. Comme nous l'avons expliqué, l'histidine distale joue un rôle majeur dans l'activité biologique. Le groupe de Watanabe a ainsi montré que des mutations au niveau de l'histidine distale pouvaient conférer à la myoglobine la fonction d'autres hémoprotéines comme par exemple une activité peroxydase ou peroxygénase.¹⁴⁵ Mais des mutations d'autres acides aminés proches du site actif peuvent également modifier l'activité biologique de la myoglobine. Le groupe de Lu¹⁴⁶ a par exemple rapporté comme contrôle de ses études, que le double mutant (L29H/F43H) de l'holo-myoglobine¹⁴⁷ possède une activité d'hème oxygénase en présence de cuivre(I).

Hayashi et ses collaborateurs ont commencé à la même période d'importants travaux sur la myoglobine et l'insertion d'hèmes modifiés dans la protéine native comme dans des mutants. Ils ont par exemple étudié les variations de différentes propriétés de certains mutants de la myoglobine, notamment au niveau de l'histidine 64, comme leur affinité pour l'oxygène et d'autres gaz tel que le monoxyde de carbone,^{148,149} ou encore leur activité catalytique pour l'oxydation du 2-methoxyphenol.¹⁵⁰

Rapidement après, un grand nombre de complexes ont été incorporés dans la myoglobine. Tous ont une structure plan-carré similaire à celle de l'hème qui leur permet de s'insérer dans la poche hydrophobe de la myoglobine et de se coordonner à une des deux histidines de cette cavité.

Nous avons déjà présenté précédemment l'utilisation de la myoglobine avec des complexes de chrome ou de manganèse et des ligands salen ou salophen (figure 39).¹³⁴ Ces hybrides

catalysent la sulfoxydation énantiosélective du thioanisole par l'eau oxygénée. La modification de certains acides aminés a une influence majeure sur le rendement de la réaction et sur l'excès énantiomérique. Par exemple, le groupe de Watanabe a étudié l'influence de différentes modifications stratégiques sur l'activité catalytique d'hybrides entre la myoglobine et deux complexes de chrome.¹⁵¹ Comme on peut le voir dans le tableau 3, le double mutant H64D/A71G Mb associé au complexe Cr.**25** a ainsi montré de bonnes propriétés catalytiques avec une activité catalytique de 78000 cycles catalytiques par seconde associé à un excès énantiomérique de 13%.

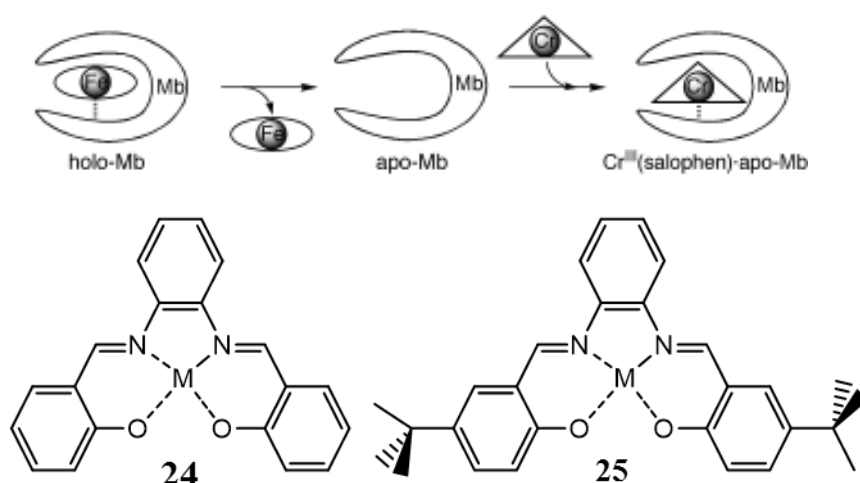


Figure 52. Haut : Préparation d'hybrides à partir de myoglobine. Bas : Structure des complexes 24 : [M^{III}(salophen)]⁺ et 25 : [M^{III}(tBu₂salophen)]⁺.

Catalyseur	Activité catalytique (10 ³ équivalents/min)	ee [%]
Cr 25 apo-Mb	46	4.3(R)
Cr 25 apo-A71GMb	54	6(S)
Cr 25 apo-H64DMb	27	0.3(S)
Cr 24 apo-H64D/A71GMb	83	8.3(S)
Cr 25 apo-H64D/A71GMb	78	13(S)
Cr 25 BSA	12	0.5(S)
Cr 25 dans le tampon	13	0

Tableau 3. Activités catalytiques et excès énantiomériques (ee) obtenus pour différents hybrides entre la myoglobine native et différents mutants et les complexes 24 et 25 de chrome pour la sulfoxydation du thioanisole (dans du tampon acétate de sodium 50 mM pH 5 à 35°C en présence de thioanisole et d'eau oxygénée).

Selon la topologie du complexe, celui-ci peut aussi se coordiner à l'histidine distale (His64) au lieu de la proximale (His93).¹⁵² C'est le cas par exemple pour certains complexes de cuivre. Dans ce cas l'histidine 64 complète la coordination équatoriale du complexe plan-carré. Cela est schématisé figure 53.

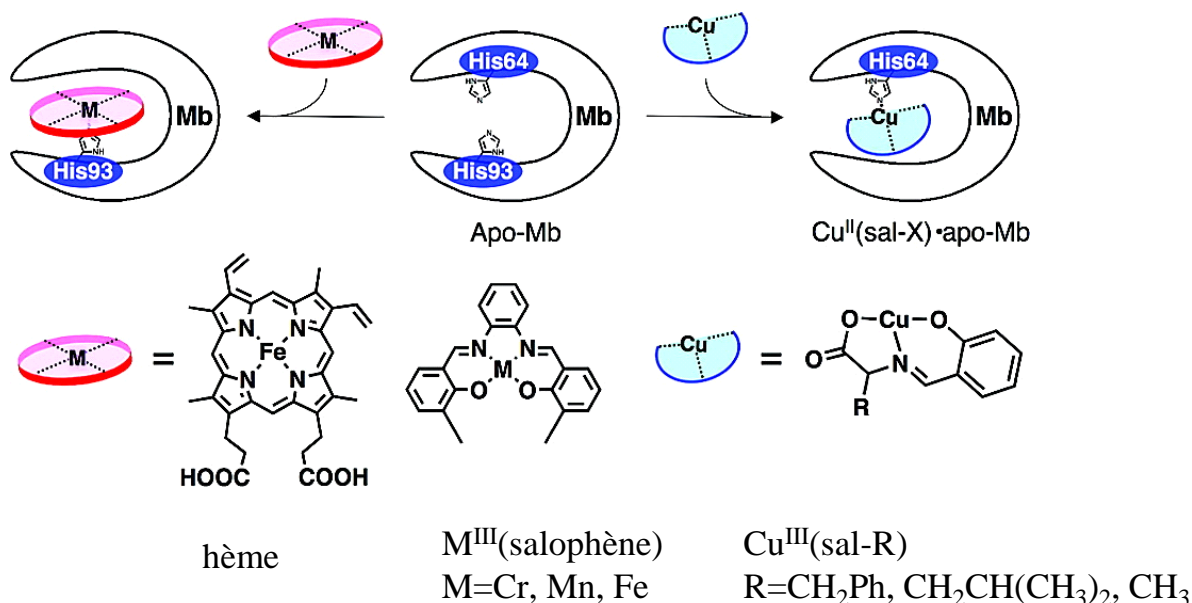


Figure 53. Méthode de préparation d'hybrides à partir de différents complexes avec 2 différents sites de coordination suivant la nature du complexe.

Dans toutes les études précédentes, l'hybride est formé par incubation entre l'apo-protéine et le complexe puis il est purifié, généralement avec une colonne d'exclusion stérique. L'obtention de l'apo-myoglobine se fait à partir d'un protocole décrit en 1981¹⁵³ consistant en une étape de dénaturation de l'holo-myoglobine par ajout de butanone en milieu acide puis une étape de dialyse pour éliminer l'hème libéré. La protéine est ensuite renaturée en présence du cofacteur d'intérêt.

Il existe une autre méthode mise au point par le groupe de Marletta¹³² évitant l'étape de dénaturation/renaturation de la protéine et consistant à reconstituer la myoglobine avec un hème légèrement modifié directement lors de la surexpression de la protéine par la bactérie.

Cela nécessite un type particulier de souche d'*E.Coli* qui, en condition de fermentation anaérobie, n'est pas capable de synthétiser un précurseur de l'hème (le porphobilinogène) et dont les parois sont perméables à l'hème. Après fermentation anaérobie pour obtenir un nombre suffisant de cellules, la surexpression de la myoglobine est induite en condition aérobie en présence de la porphyrine d'intérêt. On obtient ainsi, après purification, une myoglobine reconstituée avec différentes porphyrines de manganèse et de fer (plus ou moins modifiées).

Cependant, même si cette méthode présente l'avantage d'éviter les étapes de dénaturation de la protéine indispensables pour obtenir la forme apo de la myoglobine, elle reste très spécifique à certains complexes non toxiques pour la bactérie et de structures assez similaires à l'hème. De plus la réussite de cette méthode semble également dépendre de la protéine puisqu'elle n'a pas pu être étendue, par exemple, au cytochrome c.

Comme nous vous l'avons expliqué précédemment, les hémoprotéines forment une grande famille de protéines et la modification de quelques acides aminés spécifiques proches du site actif permet de moduler leur activité. Certaines protéines de ce groupe ont montré de plus un comportement similaire à la myoglobine vis-à-vis des différents complexes inorganiques insérés. Ainsi, l'équipe de Watanabe a réussi à préparer des hybrides à partir d'hème oxygénase avec des complexes de structures similaires (figure 54) à ceux utilisés pour les hybrides avec la myoglobine puisqu'ils ont utilisé des ligands dérivés des salophens.¹⁵⁴

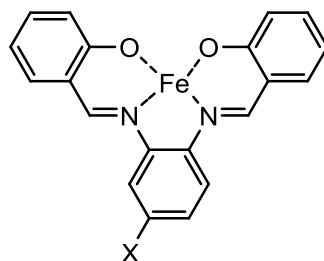


Figure 54. Structure des complexes de Fe^{III} 26: $\text{X}=\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, 27: $\text{X}=\text{COOH}$, 28: $\text{X}=\text{H}$.

Les hybrides obtenus ont montré une activité catalytique pour la réduction du dioxygène couplée à l'activité de la cytochrome P450 réductase en présence de NADPH. Ils ont ainsi réussi à reproduire une partie de l'activité biologique de l'holo-hème oxygénase. En effet l'hème oxygénase est une hémoprotéine dont le rôle biologique est de catalyser, en présence de la cytochrome P450 réductase et d'oxygène, la dégradation de l'hème en biliverdine par réaction redox suivant le mécanisme schématisé figure 55.

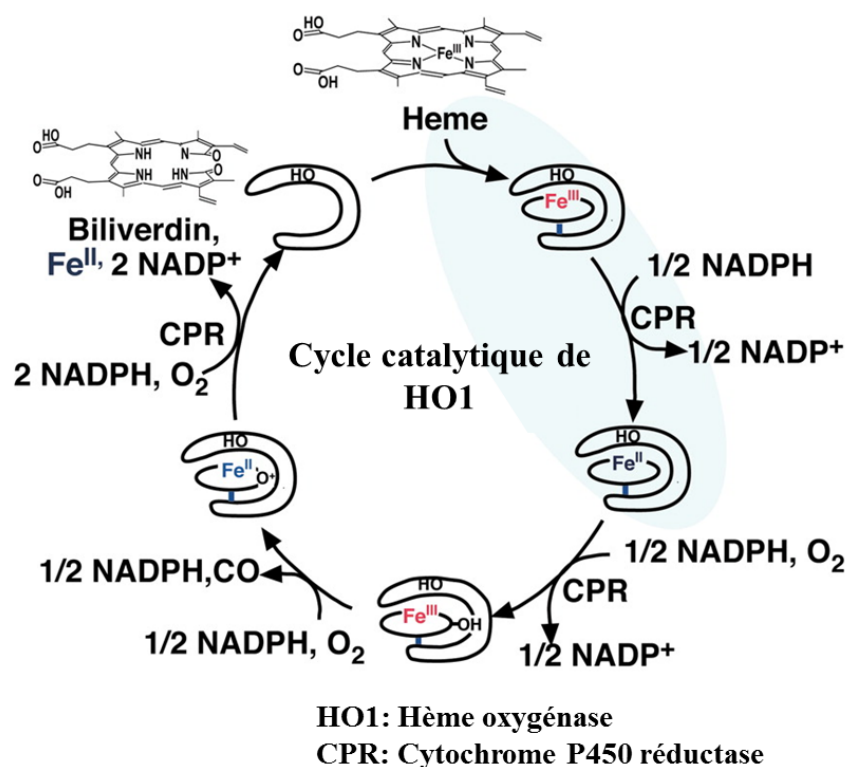


Figure 55. Cycle enzymatique du métabolisme de l'hème en biliverdine catalysée par l'hème oxygénase.

Comme pour les exemples précédents, certains acides aminés (l'arginine 177 dans ce dernier cas) jouent un rôle majeur dans l'activité catalytique de la protéine native et des hybrides. De plus cette étude a montré que l'environnement protéique influençait le potentiel électrochimique de l'espèce électroactive. En effet, les potentiels électrochimiques des complexes (26), (27) et (28), décrits figure 54, changent considérablement lorsqu'ils sont dans la protéine. Cette variation dépend fortement de la nature du complexe. Les complexes (26) et (28) ont par exemple des potentiels très proches (-59mV et -58mV vs NHE dans le DMF respectivement) alors que, lorsqu'ils sont insérés dans la protéine, leurs potentiels mesurés dans du tampon Tris sont très différents (-76mV pour (26)-HO1 contre 15mV pour (28)-HO1)

Nous avons donc montré au cours de cette étude que la préparation d'enzyme artificielle nécessite un travail à la fois sur la nature du complexe et sur la nature de la protéine. L'observation d'une interaction entre le complexe inorganique non biologique et l'enveloppe protéique est la première étape d'une longue succession d'essais (expérimentaux ou effectués par des méthodes in silico) pouvant mener à terme à l'obtention de catalyseurs performants. L'environnement protéique peut moduler à la fois l'activité catalytique du catalyseur, son potentiel électrochimique mais également influencer l'excès énantiomérique de la réaction.

Lors de cette thèse, nous avons choisi d'étudier l'influence d'une enveloppe protéique sur des complexes inorganiques catalysant la production d'hydrogène. Notre choix s'est porté sur la myoglobine comme protéine hôte pour nos études, choix que nous avons ensuite élargi à d'autres hémoprotéines. Pour les catalyseurs nous avons choisi de travailler avec des catalyseurs de cobalt ayant une structure plan carrée (cobaloximes et complexes de cobalt diimine dioxime).

Cette étude bibliographique nous a conduits, dans le cadre de cette thèse, à concentrer nos études sur l'utilisation de complexes bio-inspirés de cobalt comme catalyseurs de production d'hydrogène. Compte tenu de la présence de ligands axiaux labiles nous nous sommes orientés vers une approche dativale, c'est-à-dire vers la coordination directe d'un acide aminé au métal. Une protéine de choix dans ce cadre est la myoglobine du fait, d'une part, de la présence du cofacteur hémique coordonné à l'histidine 93 et d'autre part, de sa grande utilisation comme protéine hôte. Comme nous le verrons par la suite d'autres hémoprotéines peuvent également être utilisées comme protéines hôtes.

- CHAPITRE II -

Catalyseurs et enveloppes protéiques

D'une manière générale les enzymes artificielles, comme définies dans le chapitre précédent, résultent de la combinaison de deux entités : l'enveloppe protéique et le complexe inorganique. Ce chapitre s'intéressera dans un premier temps au choix de ces deux partenaires puis à la production et à la purification de la protéine majoritairement utilisée pour l'étude, la myoglobine de cachalot, sous une forme apo, c'est-à-dire dépourvue de son cofacteur naturel.

1. Choix du système d'étude

Tout comme la fonction chimique de l'enzyme est apportée par le site actif, celle de l'enzyme artificielle est apportée par le complexe inorganique qu'on incorpore dans l'enveloppe protéique. Il faut donc, une fois le complexe qui apportera l'activité catalytique de l'enzyme artificielle identifié, choisir l'enveloppe protéique la plus adaptée.

1.1. Les catalyseurs utilisés

Lors de ce projet nous avons décidé d'exploiter comme catalyseurs exclusivement des complexes de cobalt ayant déjà montré de bonnes propriétés catalytiques pour la production d'hydrogène en milieu organique. La 1^{ère} génération de ces catalyseurs, les cobaloximes, est à base de ligands glyoximes, dont la structure générale est représentée figure 56 et la seconde génération sont des complexes diimine dioxime de cobalt dont une structure est présentée figure 58. Notre équipe possédait en effet dès le début du projet une grande expertise pour la synthèse et l'étude de l'activité catalytique de ces complexes,^{11,12,13,96} comme je l'ai développé dans le premier chapitre.

1.1.1. Les cobaloximes

Les metaloximes est le nom générique pour désigner la famille de complexes à base de ligands glyoximato. Comme on l'a vu au chapitre I, ces ligands permettent une grande flexibilité de synthèse puisqu'on peut modifier les groupements alkyls ou aryls R, les groupes pontants X ainsi que les ligands axiaux L1 et L2.

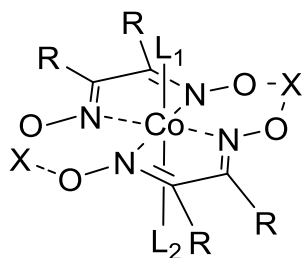


Figure 56. Structure générale d'une cobaloxime indiquant les modifications possibles au niveau des groupements alkyl ou aryl R, les groupes pontants X et les ligands axiaux L1 et L2.

Notre choix s'est porté sur deux de ces complexes dont les structures sont représentées ci-dessous : $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$.

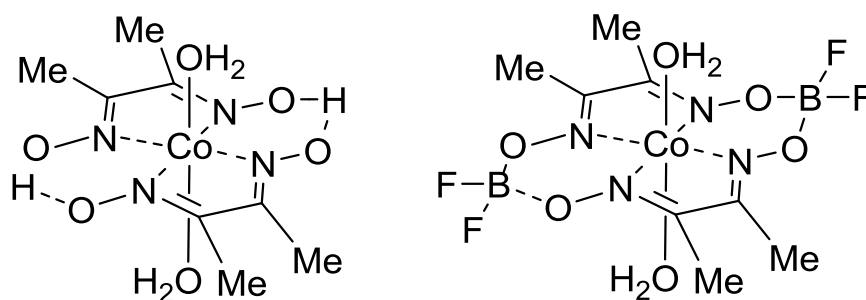


Figure 57. Cobaloximes $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (gauche) et $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (droite).

Il s'agit de complexes pseudo-macrocycliques de cobalt(II) solubles dans l'eau (jusqu'à environ 1 mM) ce qui est important à la fois pour la préparation des biohybrides mais aussi pour pouvoir comparer plus facilement les propriétés de ces derniers avec celles des complexes seuls dans des conditions similaires.

Ces deux complexes ont montré une activité catalytique pour la production d'hydrogène en milieux organique ou mixte organique/eau et également dans quelques cas en milieu uniquement aqueux (cf. Chapitre I). Ils sont de plus sensibles à l'oxydation par l'oxygène de l'air avec un potentiel redox du couple $\text{Co(II)}/\text{Co(III)}$ plus faible que celui du couple $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$. Dans ce contexte, le complexe $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ est moins sensible à l'oxygène que $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ car le potentiel redox du couple $\text{Co(II)}/\text{Co(III)}$ de ce complexe est plus élevé (+0.6 V et +0.15 V vs Ag/AgCl respectivement dans du DMF à 100 mV/s).^{12,13}

Une des limites à leur activité est la dégradation du complexe par hydrolyse ou protonation des ponts entre les ligands glyoximato, qui génère deux ligands bidentes neutres ayant peu d'affinité pour l'ion cobalt. La présence de ponts difluoroborates dans le complexe $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ limite cette hydrolyse mais ne l'empêche pas totalement ceux-ci pouvant être lentement hydrolysés. C'est pour cela que l'équipe a développé une deuxième génération de complexes, les complexes diimine dioxime de cobalt.

1.1.2. Les complexes diimine dioxime de cobalt

Les ligands diimine dioxime proviennent de la condensation de deux alcanedione monoxime avec un diaminoalcane, formant un ligand tétradente occupant les quatre positions équatoriales autour de l'ion cobalt.

Lors de cette étude, nous avons décidé d'utiliser le complexe $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$, dont la structure est représentée figure 58, formé par condensation de 1,3-propane-diamine et de butanedione-monoxime.

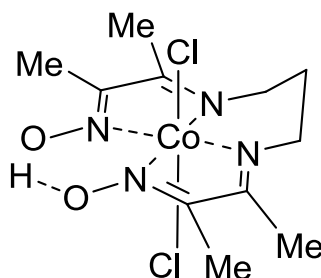


Figure 58. Complexe diimine dioxime de cobalt(III) $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$.

Ce complexe est soluble dans l'eau et son homologue avec deux bromes comme ligands axiaux a montré une des meilleures activités catalytiques en milieux organique.¹¹ Contrairement aux cobaloximes, les complexes diimine dioxime de cobalt ne contiennent qu'un seul « pont » entre deux fonctions oximes dans le plan équatorial, au lieu de deux pour les cobaloximes. Ainsi la protonation ou l'hydrolyse de ce pont ne détruit pas la nature tétradente du ligand diimine dioxime qui conserve donc une bonne affinité pour l'ion cobalt.

Nous avons également été amenés à faire des tests préliminaires, non concluants, avec un complexe diimine dioxime de nickel. Nous avons choisi de réaliser ces tests avec le complexe $[\text{Ni}\{(\text{MO})(\text{MOH})\text{pn}\}\text{Cl}]$, dont la structure est représentée figure 59 et dont le ligand diimine dioxime ne porte que deux groupement méthyles sur les quatre car le complexe $[\text{Ni}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}]$ n'a pas montré de bonne activité catalytique pour la production d'hydrogène.¹¹

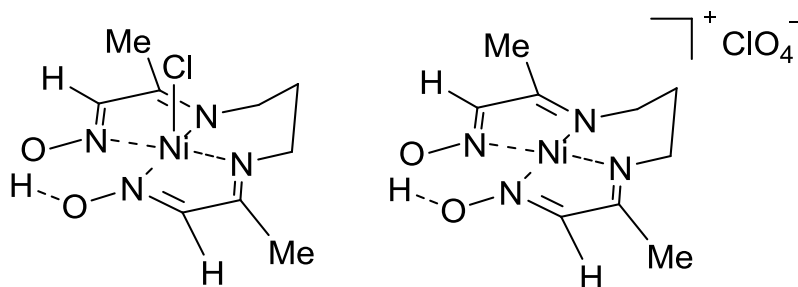


Figure 59. Complexe diimine dioxime de nickel $[\text{Ni}\{(\text{MO})(\text{MOH})\text{pn}\}\text{Cl}]$ et $[\text{Ni}\{(\text{MO})(\text{MOH})\text{pn}\}]\text{ClO}_4$.

1.1.3. Analogie avec l'hème

L'étape suivante est le choix de l'enveloppe protéique. Comme nous l'avons vu dans le chapitre I il existe trois modes principaux de fixation d'un complexe inorganique dans une enveloppe protéique.

Deux de ces méthodes impliquent la formation d'une liaison covalente soit avec un ou des acides aminés de la protéine, soit avec le cofacteur naturel de l'enzyme. L'équipe est parvenue à fonctionnaliser ces complexes¹⁰⁷ au niveau du pont propylène du ligand diimine dioxime. Cependant la méthodologie employée introduit un espaceur de grande taille, peu compatible avec la fixation du complexe à l'intérieur d'une cavité protéique. Les tentatives initiales de fonctionnalisation du complexe diimine dioxime de cobalt avec un espaceur plus petit afin de pouvoir être introduit dans la protéine, entreprises au début de mon projet de thèse, ayant été plutôt infructueuses nous n'avons pas poursuivi dans cette voie.

La dernière méthode consiste à utiliser certains acides aminés comme ligands du centre métallique au sein du complexe. Or, outre le fait que les cobaloximes ainsi que les complexes diimine dioxime de cobalt catalysent la même réaction chimique, ils ont des caractéristiques structurales assez similaires. Il s'agit de complexes de cobalt de géométrie octaédrique pouvant être assimilée à une structure de géométrie plan carré fixant deux ligands axiaux souvent plus labiles. Ces derniers peuvent en effet être facilement échangés sans affecter de manière majeure les propriétés catalytiques. Ils peuvent ainsi être substitués par des ligands azotés, comme par exemple la pyridine ou l'histidine,¹³ avec lesquels le cobalt a une bonne affinité.

Il s'avère qu'il existe dans la nature des complexes également macrocycliques de structures plan-carré fixés dans les protéines par liaison axiale du métal avec une histidine: les métalloporphyrines et plus particulièrement la protoporphyrine IX de fer appelée communément hème. Il s'agit du cofacteur naturel d'une grande famille de protéines : les hémoprotéines. Nous avons ainsi décidé d'utiliser certaines hémoprotéines comme protéines hôtes des complexes de cobalt lors de cette étude.

1.2. Les hémoprotéines

Le groupe des hémoprotéines est une grande famille de protéines particulièrement étudiées dans la communauté scientifique et d'ailleurs utilisées de manière extensive pour la fabrication d'enzymes artificielles, comme nous l'avons décrit au chapitre I.

1.2.1. La myoglobine

La première protéine ayant retenu notre attention est la myoglobine. Il s'agit d'une protéine globulaire possédant une poche hydrophobe dans laquelle peut s'insérer un hème (il s'agit alors de la forme holo de la protéine en comparaison à la forme apo sans cofacteur). La liaison entre l'hème et la myoglobine se fait par interaction entre le fer et une histidine présente dans la poche et appelée histidine proximale. Une deuxième histidine, l'histidine distale, est également disponible dans la poche hydrophobe mais ne se coordine pas au fer de l'hème, à la différence de ce qui est observé dans certains cytochromes. Comme nous l'avons vu au chapitre I, cette histidine, par ses interactions avec le dioxygène coordonné en axial de l'hème, influence l'activité biologique de la myoglobine.

Les premiers essais ont été effectués par Claire Callot, en stage de Master 2 avant mon arrivée au laboratoire, avec de la myoglobine de cœur de cheval présentant l'avantage d'être disponible commercialement. Cependant cette protéine a montré certains problèmes de stabilité lors de la formation d'hybrides et est, de plus, assez difficile à cristalliser.

Nous avons donc décidé de nous orienter vers la myoglobine de cachalot, que nous écrirons MbSw pour Sperm whale myoglobin, qui a été particulièrement étudiée car disponible commercialement en grande quantité jusqu'à la fin des années 80 (la pêche du cachalot a alors été interdite mondialement) et qui possède une meilleure stabilité en solution.

Cette protéine, dont la structure est représentée figure 60, possède les caractéristiques générales des myoglobines présentées plus haut. Plus spécifiquement, elle possède 153 acides aminés pour une masse globale de 17331 Da et est structurée en 8 hélices alpha notées de A à H connectées entre elles par 7 boucles. Il s'agit d'une protéine particulièrement basique (pI théorique de 8.7) avec une structure en solution globulaire et monomérique. L'hème se coordine à la protéine via l'histidine 93 (histidine proximale), l'histidine distale étant en position 64.

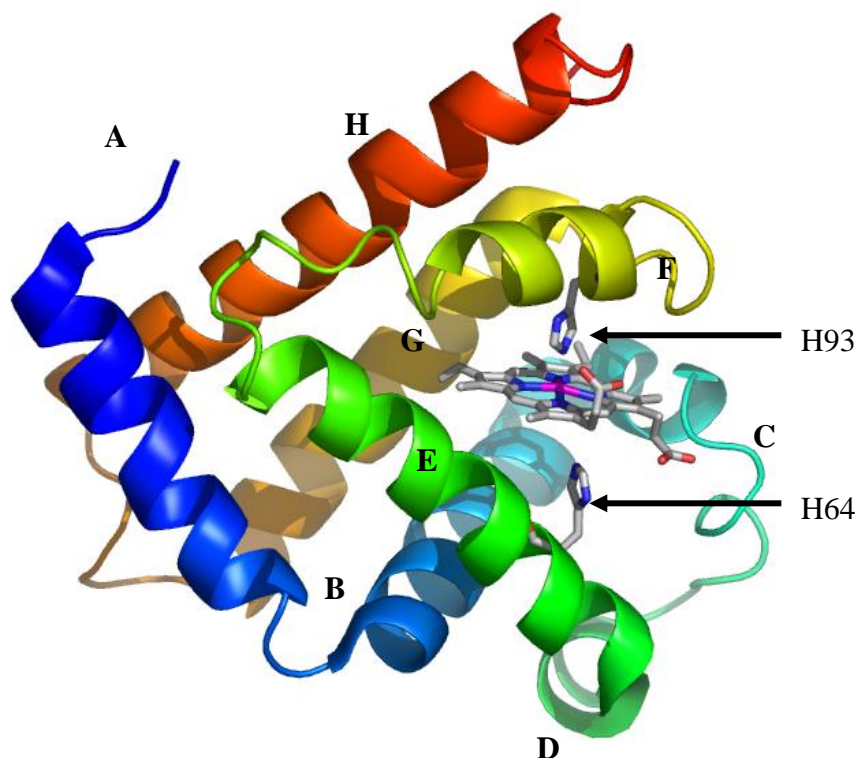


Figure 60. Structure de la myoglobine de cachalot avec les deux histidines distales (H64) et proximale (H93) impliquées dans la fixation de l'hème et de l'oxygène. (code PDB: 1MBN)

De nombreuses études ont été faites sur le repliement de la myoglobine de cachalot dans la forme apo. Elle peut se déplier et se replier selon le pH de la solution et également selon la concentration d'une espèce dénaturante comme l'urée. Son repliement est structuré autour de quatre formes principales (figure 61): la forme dépliée (U) présente principalement autour de pH 2, deux formes intermédiaires « molten globule » partiellement repliées à pH 4 (I_a et I_b) et enfin la forme dite native (N) à partir de pH 6 présentant la structure tertiaire et la rigidité de la myoglobine native excepté pour quelques zones (l'hélice F par exemple se structure autour de l'hème).¹⁵⁵⁻¹⁵⁷

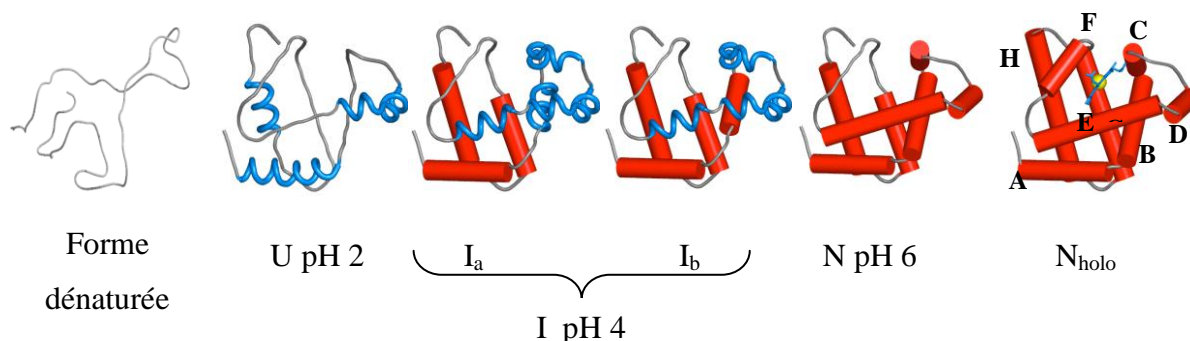


Figure 61. Structures tertiaires des intermédiaires de repliement de l'apo-myoglobine de cachalot suivant leurs prédominances en fonction du pH. Les cylindres rouges représentent la localisation des hélices stables alors que les repliements en forme d'hélices bleues représentent la localisation des hélices instables.^{158,159}

La formation de l'holo-myoglobine se déroule en deux temps.^{156,160,161} Il y a un premier équilibre entre la forme apo de la protéine et la protéine coordonnée à l'hème. Dans un deuxième temps la protéine (et en particulier l'hélice F) se structure autour de son cofacteur et ceci de manière irréversible. On ne peut donc pas parler de constante de dissociation entre l'hème et la myoglobine mais on parle plutôt dans ce cas d'affinité. La grande affinité de l'hème pour la myoglobine (10^{14} M^{-1}) est due à différents phénomènes : l'affinité propre entre l'hème et l'histidine 93 (avec une constante d'équilibre d'environ 10^3 - 10^4 M^{-1}), l'existence d'interactions à la fois non spécifiques entre l'hème et la poche hydrophobe (participant d'un facteur 10^5 - 10^7 M^{-1}) et spécifiques avec certains acides aminés bien conservés de la poche héminique (participant pour un facteur 10^3 - 10^4 M^{-1}).¹⁶⁰

Cette protéine est la base des travaux effectués lors de cette thèse. Cependant, comme la formation d'enzymes artificielles nécessite d'affiner l'accord entre l'enveloppe protéique et le complexe inorganique, nous avons également utilisé d'autres protéines.

1.2.2. L'hème oxygénase

La deuxième protéine utilisée est l'hème oxygénase. Cette hémoprotéine a également une structure globulaire composée majoritairement d'hélices alpha. Ces dernières sont repliées de manière à former une zone hydrophobe entre deux hélices, la proximale et la distale, dans laquelle une seule histidine est disponible. Il s'agit donc d'un bon candidat pour étudier l'influence de la présence d'une deuxième histidine dans la myoglobine ainsi que l'influence de l'environnement protéique sur les propriétés des hybrides. De plus, l'hème oxygénase présente l'intérêt, pour les tests catalytiques visés au cours de l'étude, de mettre en jeu dans sa fonction biologique des transferts électroniques entre l'hème contenu dans la poche de l'hème oxygénase et la cytochrome P450 reductase qui vient interagir à sa surface.

Nous avons eu la possibilité via une collaboration avec le Pr. Masao Ikeda-Saito de l'université de Tohoku au Japon de travailler avec des hèmes oxygénases de deux organismes différents : l'hème oxygénase 1 de rat (HO1) et l'hème oxygénase de la bactérie *Corynebacterium diphtheriae* (HmuO).

L'hème oxygénase 1 de rat est une des trois isoformes (groupe de protéines du même organisme à séquence et fonction identiques) de l'hème oxygénase présentes chez le rat. Il

Chapitre II – Catalyseurs et enveloppes protéiques

s'agit d'une protéine de 32 kDa possédant 289 acides aminés et possédant un domaine C terminal très hydrophobe permettant une fixation à la membrane.

Nous avons travaillé avec une fraction de 30kDa de cette protéine composée des 267 premiers acides aminés présentant l'avantage d'être parfaitement soluble et ayant les mêmes propriétés structurales et catalytiques que la protéine entière.¹⁶²

La structure de l'holo-HO1 est représentée figure 62. La fixation de l'hème se fait via la coordination du fer à l'histidine 25. Une molécule d'eau ou un ion hydroxyde vient compléter sa sphère de coordination. On peut noter que deux résidus glycines (G139 et G143) appartenant à l'hélice distale jouent en quelque sorte le rôle de l'histidine dans la myoglobine de cachalot en établissant des liaisons hydrogène avec la molécule d'eau ou l'ion hydroxyde coordonné en axial en *trans* de l'histidine 25.

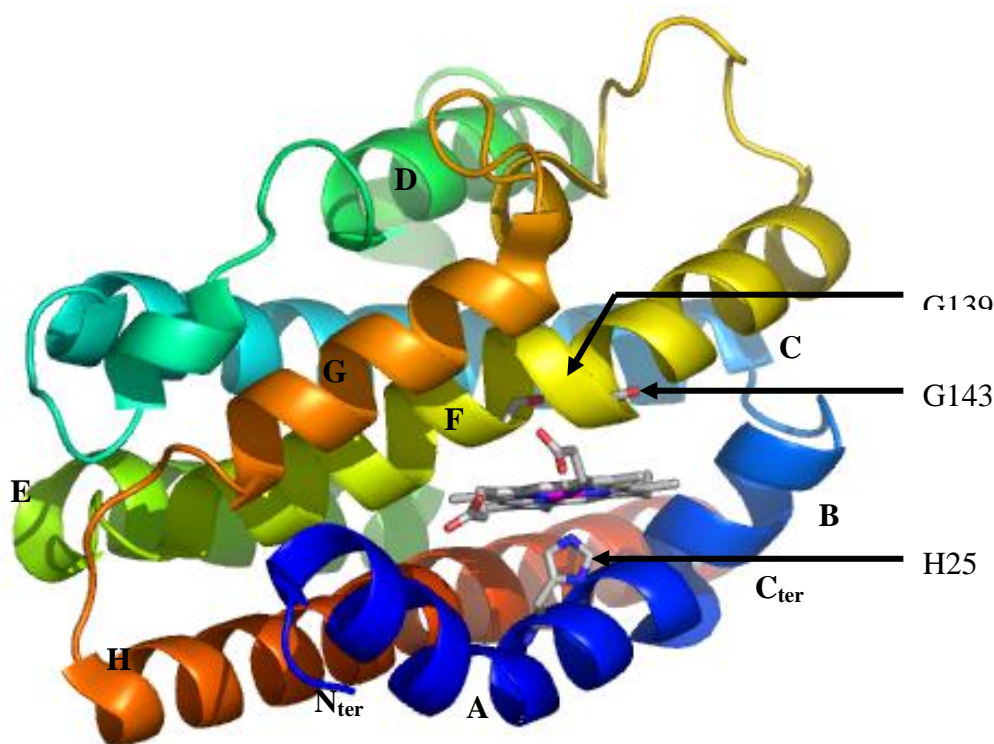


Figure 62. Structure cristalline de l'hème oxygénase de Rat 1 avec son hème. (code PDB : 1DVE)

L'hème oxygénase de la bactérie *Corynebacterium diptheriae* ne possède pas de zone de fixation membranaire et est donc soluble sous sa forme globale. Elle est également plus petite puisqu'elle possède 215 acides aminés pour une masse moléculaire de 24 kDa. De plus elle présente un alignement de séquence d'environ 34 % et une structure tertiaire très similaire à HO1 avec une majorité d'hélices alpha. Comme on peut le voir sur la structure représentée figure 63, l'hème est maintenu entre l'hélice distale et l'hélice proximale par l'histidine 20 et seul un résidu glycine, la glycine 135, établit des liaisons hydrogène avec le ligand distal de

l'hème. Cependant malgré ces grandes similitudes, l'hème n'a pas la même orientation dans la cavité protéique de HmuO que dans celle de HO1.¹⁶³ En effet à la fois l'analyse de la structure cristallographique et des études RMN en solution montrent qu'il y a une rotation de 180° de l'hème intervertissant la position des groupements méthyle et vinyle. Ce résultat confirme le fait que même de légères différences dans l'environnement du complexe influencent, entre autre, l'orientation de ce dernier dans la protéine et nous a amené à étudier également les hybrides basés sur cette enveloppe protéique. De plus HmuO présente de meilleures propriétés de cristallisation que HO1.

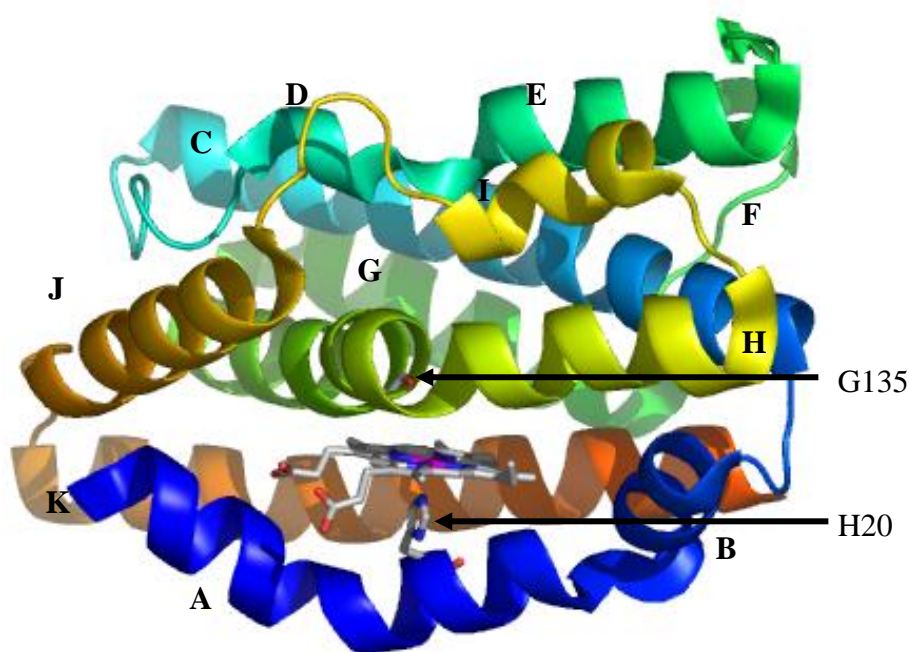


Figure 63. Structure cristalline de l'hème oxygénase de bactérie *Corynebacterium diptheriae*. (code PDB : 1IWO)

1.2.3. FixL

Enfin, nous avons également initié l'étude d'hybrides à partir d'une autre hémoprotéine, FixL de *Bradyrhizobium japonicum*, obtenue via une collaboration avec Ursula Liebl du Laboratoire d'Optique et Bioscience (Structure mixte INSERM, CNRS, Ecole Polytechnique UMR 7645). FixL appartient à la famille des régulateurs à deux composants et détecte la présence ou l'absence d'oxygène. Cette protéine a une structure différente des deux autres.¹⁶⁴

Elle est composée de 3 domaines représentés figure 64: une région hydrophobe ancrée dans la membrane cellulaire (TM : domaine transmembranaire), le domaine héminique de la protéine (domaine PAS présent dans beaucoup de protéines senseurs) et enfin un domaine enzymatique histidine kinase du senseur. La région transmembranaire étant insoluble et pas indispensable

Chapitre II – Catalyseurs et enveloppes protéiques

pour la liaison de l'hème nous avons été amenés à travailler avec la protéine tronquée de cette partie (comme ce qui a été fait pour l'hème oxygénase 1 de rat) pour faciliter sa production et sa purification.

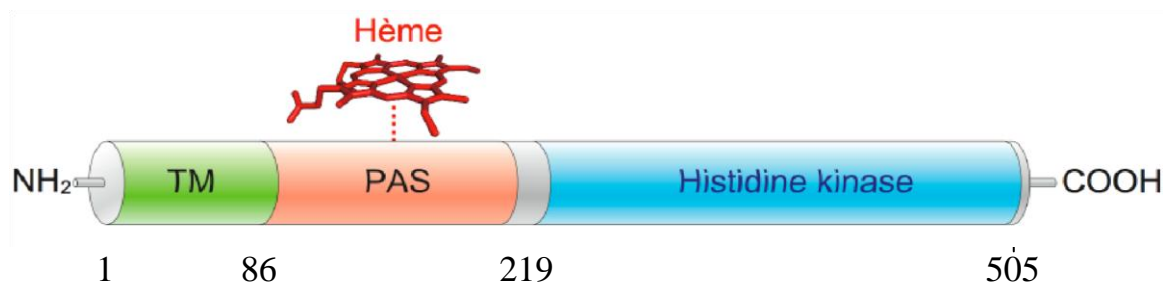


Figure 64. Organisation schématique en domaines de la protéine FixL de *Bradyrhizobium japonicum*. L'extrémité Nterminale contient le segment membranaire hydrophobe, suivi du domaine PAS liant l'hème. Figure extraite de la référence 16.¹⁶⁵

Contrairement aux hémoprotéines les plus étudiées qui possèdent principalement des hélices alpha, la structure du domaine héminique de FixL est majoritairement composée de cinq feuillets bêta antiparallèles (A, B, G, H, I), forme typique d'une structure en « tonneau ».¹⁶⁶ Cependant, comme pour la myoglobine ou l'hème oxygénase, la fixation de l'hème dans le domaine PAS se fait par coordination avec une histidine et l'hème se retrouve dans une poche hydrophobe comme on peut le voir dans la structure détaillée figure 65.

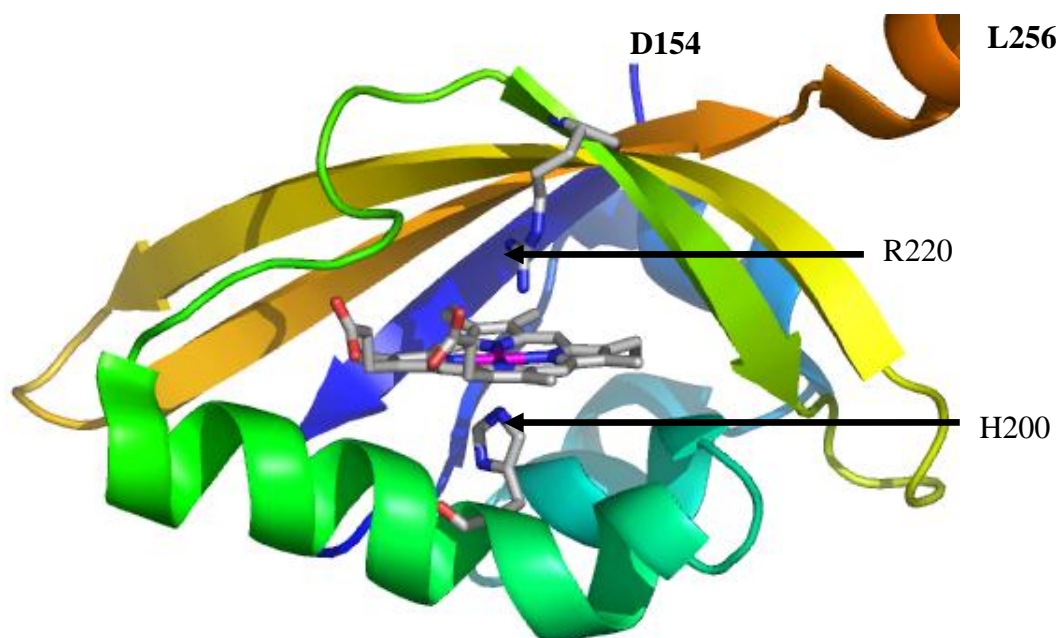


Figure 65. Structure cristalline du domaine héminique (des acides aminés 141 à 256) du senseur de la protéine FixL de *Bradyrhizobium japonicum*. (Code PDB : 1DP6)

La première partie de mon projet a ainsi consisté à maîtriser l'expression et la purification de l'apo-myoglobine de cachalot au laboratoire.

Les deux parties suivantes seront donc consacrées à la mise au point d'un protocole permettant d'obtenir l'apo-myoglobine de cachalot fonctionnelle, c'est-à-dire capable d'insérer correctement un hème dans sa cavité protéique. La production d'apo-myoglobine de cachalot a été faite dans des cellules BL21(DE3) d'*Escherichia Coli* (cf. partie Matériels et Méthodes). Différents plasmides et différentes conditions de culture ont été testés afin d'optimiser la quantité et la qualité d'apo-myoglobine produite.

2. Tentatives d'obtention directe de la myoglobine soluble

2.1. Production de la myoglobine de cachalot sous forme soluble

Un premier test a été effectué avec le plasmide puc19-Mb obtenu de l'équipe de Sligar qui avait décrit la purification de l'apo-myoglobine à partir de ce plasmide.^{167,168} Ce plasmide possède le gène codant pour une protéine de résistance à l'ampicilline nous permettant de sélectionner les bactéries l'ayant intégré.

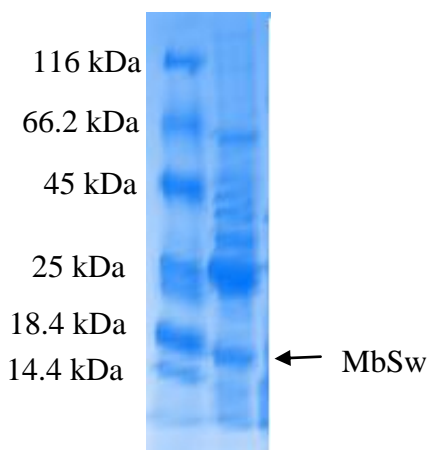


Figure 66. Gel SDS-PAGE 15% des fractions obtenues après chromatographie d'exclusion moléculaire. De gauche à droite : Marqueur Moléculaire, extraits cellulaires.

Des cellules compétentes BL21(DE3)* sont préalablement transformées avec le plasmide. L'étude par gel SDS/PAGE des extraits cellulaires obtenus nous a permis de constater qu'il y avait une faible production de myoglobine (la bande correspondant à la myoglobine de cachalot a été confirmée par séquençage N-terminal après transfert de la bande protéique du gel vers une membrane).

Nous avons donc décidé de changer de plasmide et d'en utiliser un dans lequel le gène codant pour la myoglobine de cachalot est sous le contrôle d'un promoteur fort. Un promoteur est une

Chapitre II – Catalyseurs et enveloppes protéiques

séquence d'ADN sur laquelle l'ARN polymérase vient se fixer avant la transcription. La force du promoteur est déterminée par l'affinité de l'ARN polymérase pour le promoteur. Plus le promoteur est fort, plus la fréquence de transcription et donc la quantité de protéine est élevée. Nous possédons également au laboratoire le plasmide pET17b-Mb.¹⁶⁹ Ce plasmide contient le gène codant pour la myoglobine de cachalot. Ce gène a été cloné entre les sites de restriction NdeI (CATATG) et BamHI (GGATCC) en aval de la séquence promotrice de l'ARN polymérase T7, promoteur fort servant d'initiateur de la transcription sous le contrôle de l'IPTG comme inducteur (figures 67 et 68). L'IPTG est un analogue du lactose, inducteur naturel interagissant avec le répresseur de la transcription de l'ARN polymérase T7. Comme l'IPTG n'est pas métabolisé par la cellule sa concentration reste constante dans le milieu et on obtient ainsi une induction constante et stable (figure 69). Le plasmide possède également un gène codant pour une protéine de résistance à l'ampicilline permettant la sélection des bactéries ayant intégré le plasmide.

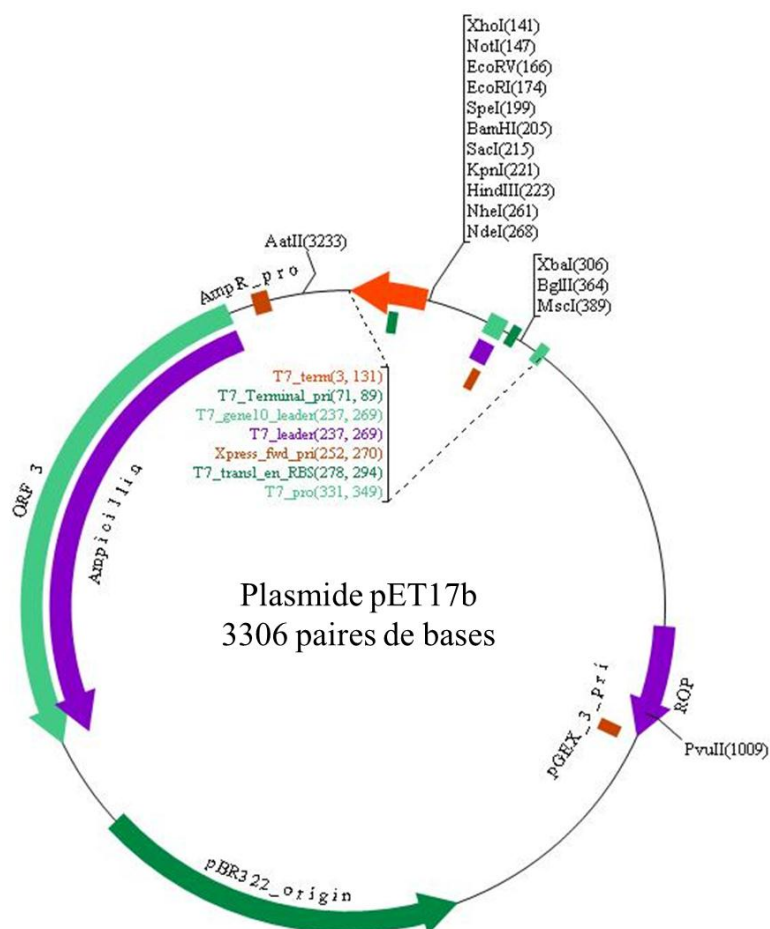


Figure 67. Schéma du plasmide pET17b avec le gène codant pour la résistance à l'ampicilline (violet), le gène pBR322 servant d'origine pour la réplication (vert) et enfin la séquence promotrice du l'ARN polymérase T7 ainsi que différents sites de restriction (orange) dont en particulier les deux sites de restriction utilisés pour l'insertion du gène de la myoglobine de cachalot NdeI and BamHI.

```

      BglII      T7 promoteur      XbaI      rbs
AGATCTCGATCCCGGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTCCCTCTAGAAATAATTTGTTAACTTTAAGAAGGAGA
      NdeI  NheI  T7-Tag      HindIII  KpnI  SacI  BamHI  SpeI      BstXI  EcoRI  EcoRV  BstXI  NotI  XhoI
TATACATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAATGGTGGGATTCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTCTGGAATTCGTCAGATATCCATCACACTGGCGCCGCTCGAG
      MetAlaSerMetThrGlyGlyGlnGlnMetGlyArgAspSerSerLeuValProSerSerAspProLeuValThrAlaAlaSerValLeuGluPheCysArgTyrProSerHisTrpArgProLeuGlu

      Bpu1102I      T7 terminateur
CAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGTGGCTGCTGCCACGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAAGGGTTTTTTTG
GlnIleArgLeuLeuThrLysProGluArgLysLeuSerTrpLeuLeuProProLeuSerAsnAsnEnd
  
```

Figure 68. Séquence du plasmide pET17b avec les différents sites clé. La zone surlignée est la zone de clonage du gène de la myoglobine.

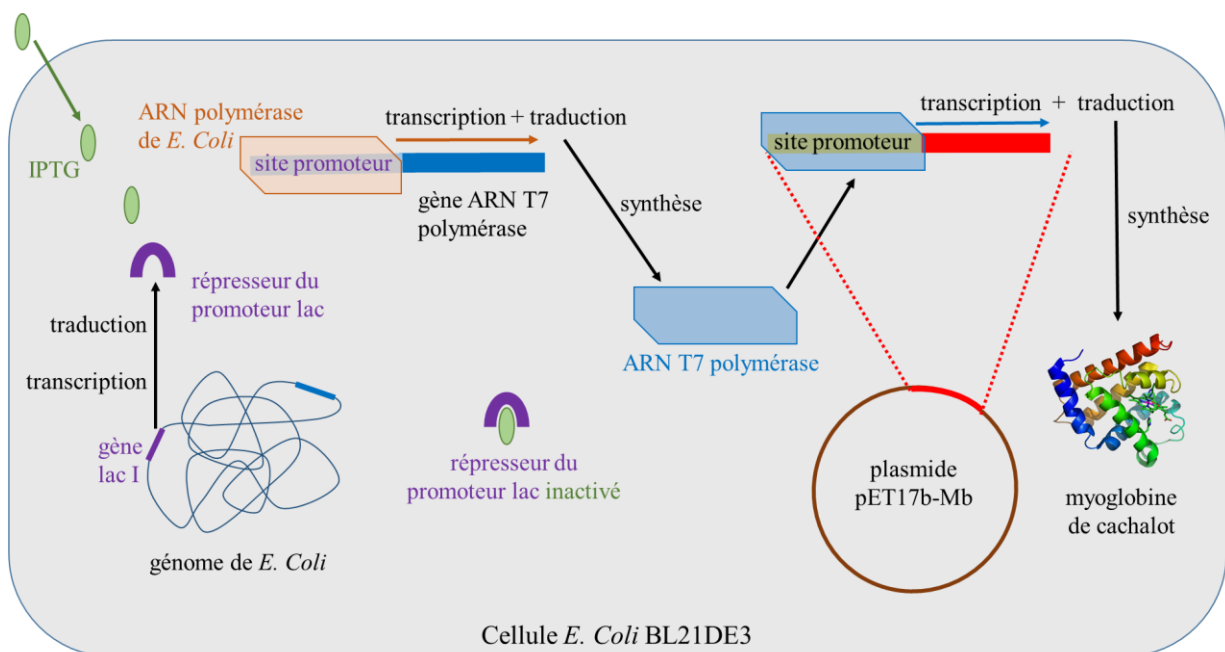


Figure 69. Schéma d'une cellule d'E. Coli avec les différents mécanismes mis en jeu lors de la production de myoglobine de cachalot à partir du plasmide pET17b-Mb avec induction à l'IPTG.

Comme précédemment, des cellules compétentes BL21(DE3)* sont transformées avec le plasmide comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes.

Après une préculture en milieu LB/Ampicilline, les cellules sont cultivées en milieu TB-ampicilline à 37°C et induites à l'IPTG toute la nuit à 15°C afin d'optimiser la quantité de myoglobine soluble.

Les cellules sont cassées par sonication et la myoglobine ainsi que les autres protéines solubles sont récupérées dans le surnageant après centrifugation. L'ADN est précipité par ajout de sulfate de streptomycine. L'analyse par gel SDS-PAGE figure 70 montre que l'on a bien surexprimé la myoglobine de cachalot par rapport aux conditions de cultures précédentes et

nous obtenons ainsi par ce protocole de surexpression 400 mg d'extraits cellulaires à partir de 44 grammes de cellules correspondant à la biomasse issue de 1.5 litres de culture

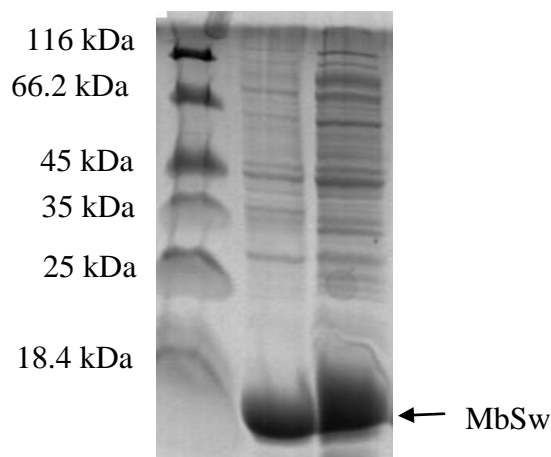


Figure 70. Gel SDS-PAGE 15%. De gauche à droite : Marqueur moléculaire, cellules après sonication et extraits cellulaires après précipitation de l'ADN.

2.2. Les différentes méthodes de purification

Il existe quatre différentes méthodes générales de purification des protéines (en dehors des chromatographies sur colonnes d'affinité spécifiques aux protéines étiquetées). Ces différentes méthodes mettent en jeu diverses propriétés et caractéristiques qui diffèrent selon les protéines. Ces dernières peuvent ainsi être séparées par :

- 1- Interaction ionique via l'utilisation d'une résine chargée soit négativement (échangeuse de cations, comme par exemple la CM Sepharose possédant des groupes terminaux carboxylates) soit positivement (échangeuse d'anions, comme par exemple la Q Sepharose possédant des groupes terminaux ammoniums quaternaires)
- 2- Précipitation sélective en jouant sur la force ionique du tampon
- 3- Interaction hydrophobe en utilisant une résine possédant des groupes hydrophobes comme par exemple la Butyl Sepharose possédant des groupes terminaux butyle
- 4- Exclusion stérique en faisant passer la solution au travers d'une résine de chromatographie par exclusion moléculaire (appelée communément Gel filtration).

Nous avons donc testé séparément les différentes méthodes et nous avons arrêté notre choix sur la combinaison de deux méthodes apportant les résultats les plus performants.

Nous avons choisi comme première étape de purification la précipitation de la majorité des protéines contaminantes dans une solution de sulfate d'ammonium à 50% de saturation. Comme on peut le voir sur la figure 71 la myoglobine se trouve principalement dans les culots à haut pourcentage en sulfate d'ammonium et est donc sous forme soluble dans une solution à

Chapitre II – Catalyseurs et enveloppes protéiques

50% de saturation en sulfate d'ammonium. Comme le présente le bilan de matière présenté en tableau 4 on élimine par ce procédé environ 40% des protéines contaminantes.

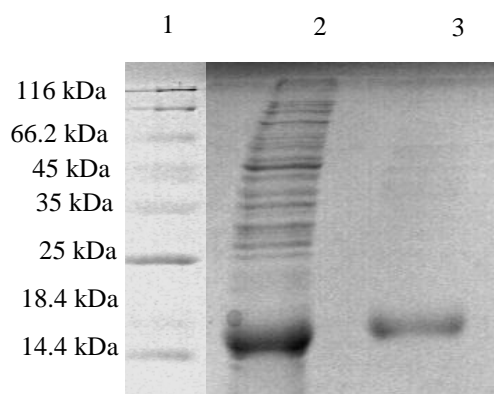


Figure 71. Gel SDS-PAGE 15% de gauche à droite: (1) Marqueur de poids moléculaire, (2) Culot à 70%, (3) Culot à 90%.

	C (mg/ml)	V (ml)	m (mg)
initialement	16	1	16
Culot à 70%	11	0.5	5.5
Culot à 90%	2.3	1.8	4.1

Tableau 4. Concentration (dosage au rose bengal), volume et masse de protéine de chaque fraction de protéine suivant la quantité de sulfate d'ammonium à laquelle elles ont précipitées.

Nous avons choisi comme seconde étape de purification une chromatographie d'exclusion moléculaire car la myoglobine est une protéine plutôt petite comparée aux autres protéines présentes. Comme le montre le gel SDS-PAGE présenté figure 72 les premières fractions récoltées après la colonne d'exclusion stérique contiennent majoritairement les protéines les plus grosses. La myoglobine arrive en fin de colonne (à partir de la fraction B9) avec une pureté jugée satisfaisante pour les premiers tests. Cette étape de purification nous permet d'éliminer la grande majorité des protéines contaminantes et de récupérer une fraction protéique composée majoritairement de myoglobine avec un rendement massique global de 50% comme le montre le bilan de matière présenté en tableau 5

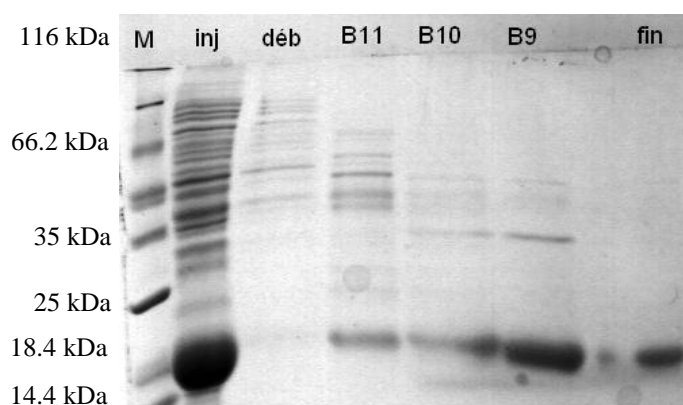


Figure 72. Gel SDS-PAGE 15% des fractions obtenues après chromatographie d'exclusion moléculaire.

	C (mg/ml)	V (ml)	m (mg)
injecté	10	1,4	14
B9	0,9	5	4,5
fin	0,5	5,2	2,6

Tableau 5. Concentration (dosage au rose bengal), volume et quantité de protéine des fractions de la chromatographie d'exclusion moléculaire.

2.3. Analyse de la protéine obtenue

La protéine obtenue dans ces conditions est verte et son spectre UV-Visible, représenté figure 73, présente deux bandes d'absorbances.

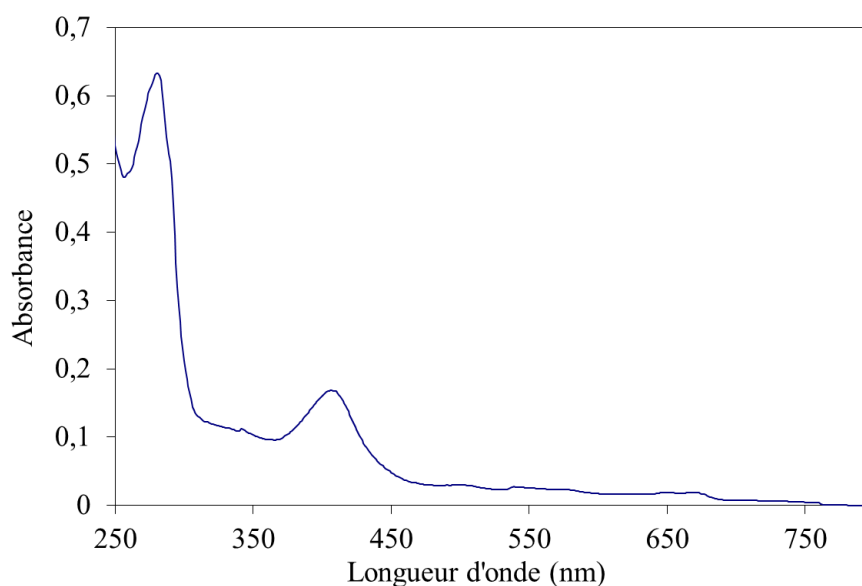


Figure 73. Spectre UV-Visible de la myoglobine de cachalot (52 μ M dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.5).

La bande la plus intense possède un maximum à 280 nm et est caractéristique des protéines puisqu'elle correspond à l'absorbance de certains acides aminés aromatiques (tryptophane et tyrosine). La seconde possède un maximum autour de 409 nm correspondant à la présence résiduelle du cofacteur hémique. En effet, *Escherichia Coli* est capable de synthétiser de l'hème qui peut être incorporé dans la myoglobine lors de sa production. De plus l'analyse par spectroscopie UV-Visible de l'holo-myoglobine reconstituée à partir de myoglobine de cheval commerciale nous a permis de connaître l'allure générale de l'holo-myoglobine. Ainsi, comme on peut le voir figure 74, il existe un rapport 5 entre le coefficient d'extinction molaire de la protéine à 409 nm et celui à 280 nm. Ce rapport nous permet de déduire que 95 % environ de la myoglobine de cachalot obtenue est sous forme apo.

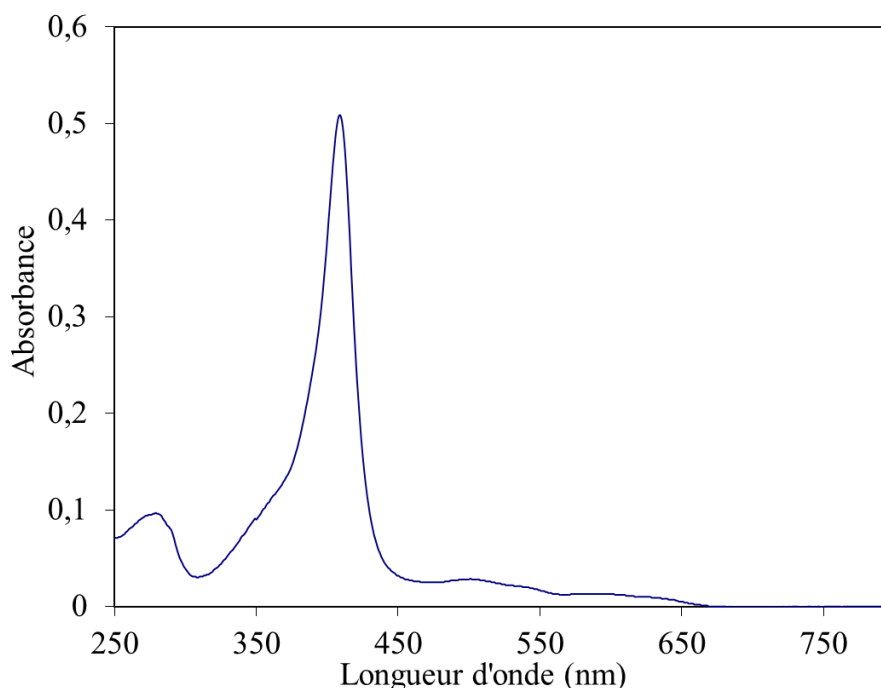


Figure 74. Spectre UV-Visible de l'holo-myoglobine de coeur de cheval (7 μ M dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.5).

Ce faible taux d'holo-myoglobine par rapport à la forme apo nous a conduit, dans un premier temps, à ne pas recourir à une étape supplémentaire, communément appelée méthode HCl-butanone, décrite en 1981 par Ascoli et ses collaborateurs.¹⁵³ Cette méthode consiste à éliminer l'hème incorporé dans la protéine par dénaturation de la myoglobine en milieu acide (pH 2.4) puis extraction de l'hème par de la butan-2-one.

Pour vérifier que la myoglobine ainsi obtenue était fonctionnelle, nous avons alors étudié sa capacité à fixer correctement son cofacteur biologique au sein de la poche hydrophobe par coordination à l'histidine proximale. Pour cela nous avons ajouté de l'hème à la solution protéique puis nous avons éliminé l'excès d'hème n'ayant pas interagi avec la protéine par chromatographie d'exclusion stérique (cf. Matériels et Méthodes).

Cependant, lors de ces essais de reconstitution, le spectre UV-Visible de la fraction hybride obtenue n'était pas en accord avec le spectre attendu pour l'holo-myoglobine. En effet, comme on peut le voir sur le spectre UV-Visible représenté figure 75, le pic d'absorbance correspondant à l'hème est décalé vers des longueurs d'ondes plus faible (maximum autour de 397 nm) et d'intensité plus faible que celle attendue pour l'holo-myoglobine (figure 74).

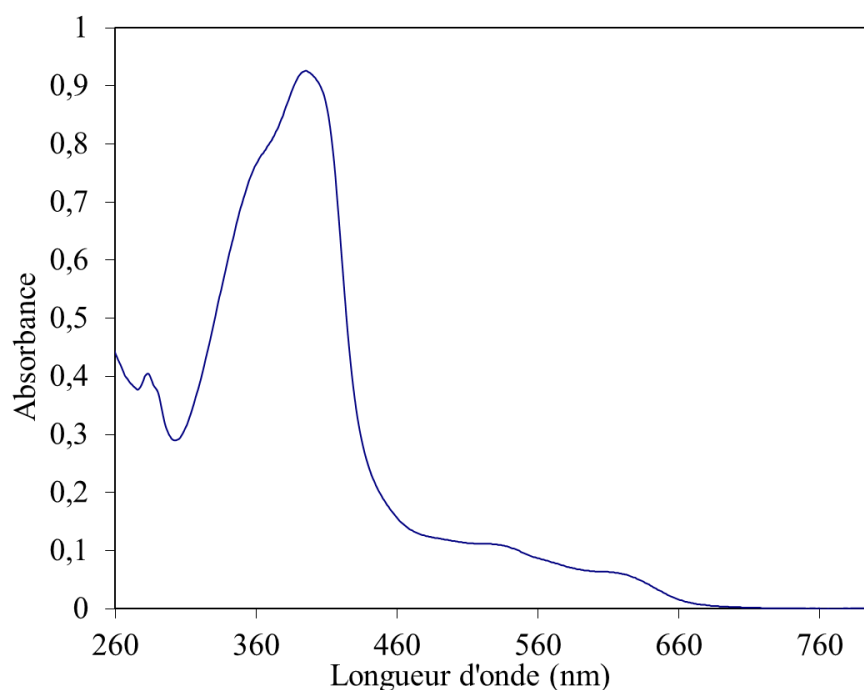


Figure 75. Spectre UV-Visible de la myoglobine en présence d'hème (23 μM dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.5).

Nous avons confirmé en ajoutant un large excès d'imidazole à la protéine ainsi reconstituée que l'hème incorporé dans la protéine interagit avec l'imidazole ce qui prouve qu'il n'est pas correctement inséré dans la cavité protéique. En effet on observe par spectroscopie UV-Visible (figure 76) un décalage de la bande de Soret du fer vers une absorbance à 410 nm dû à la coordination de l'imidazole avec le fer de l'hème.

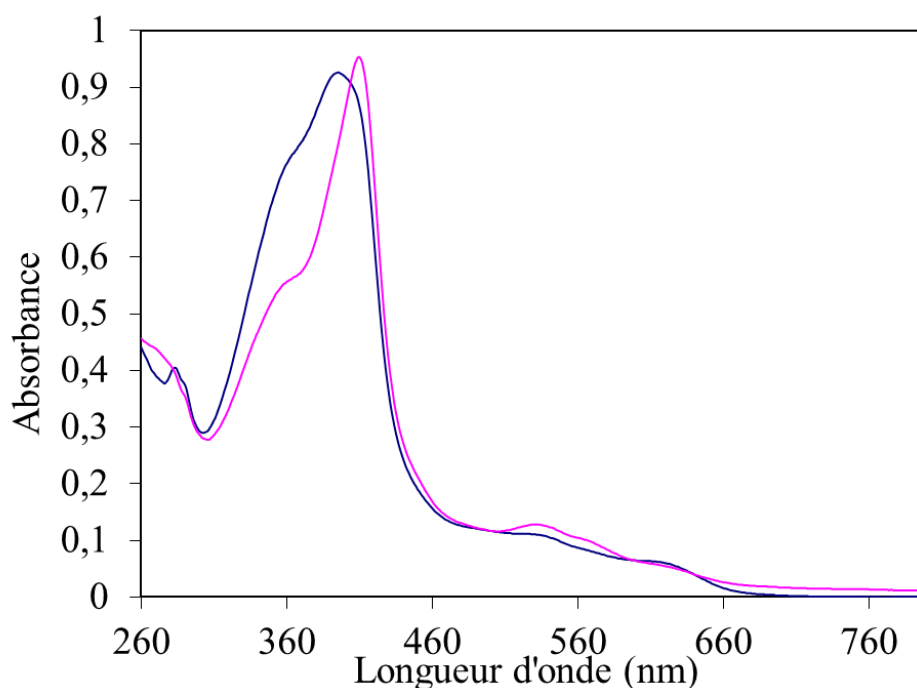


Figure 76. Spectres UV-Visible de la myoglobine ayant incorporé de l'hème en absence d'imidazole (bleu) et en présence d'un excès d'imidazole (rose) (24 μM en protéine dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.5).

Or il a été montré¹⁷⁰ par l'équipe de Dawson que le mutant H93G de la myoglobine de cachalot, ne possédant donc pas l'histidine proximale de fixation de l'hème, a un comportement similaire en présence d'imidazole. Il est montré de plus par structure cristallographique que dans cette situation l'imidazole vient compléter la sphère de coordination de l'hème qui se retrouve alors probablement dans une position et avec une sphère de coordination assez similaire à celles qu'il a dans l'holo-myoglobine, le maximum d'absorbance de la bande de Soret du fer dépendant fortement de la coordination en position axiale de l'hème. Ce résultat indique donc que la myoglobine obtenue n'est pas repliée de manière correcte et que l'hème n'interagit pas complètement avec l'histidine 93. Cependant, le séquençage N_{terminal} du plasmide nous a permis de confirmer la présence de l'histidine 93 dans la séquence.

Finalement, l'analyse par spectrométrie de masse en condition dénaturante de la protéine obtenue a montré la présence d'un grand nombre de modifications chimiques sur la structure primaire de la protéine.

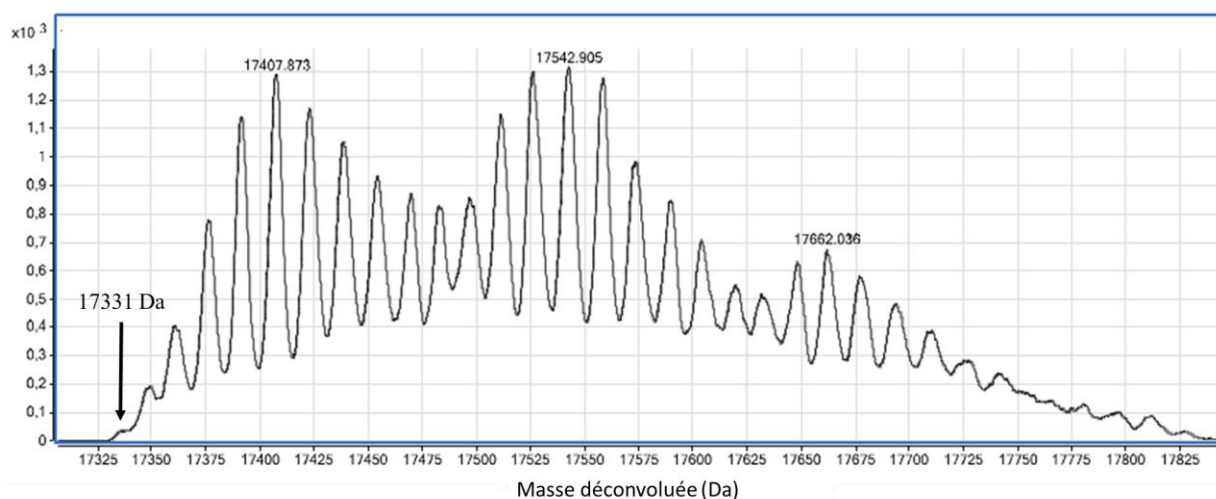


Figure 77. Spectre de masse en condition dénaturante déconvolué de la protéine obtenue.

L'ensemble de ces éléments permet d'affirmer que la protéine obtenue n'est pas la myoglobine de cachalot native mais qu'elle a subi une ou plusieurs modifications qui font qu'elle n'est pas capable de se structurer correctement autour de son cofacteur naturel. Cependant ces différentes études nous ont permis de mieux connaître le comportement de la myoglobine en présence d'hème et les caractéristiques spectrales associées. Nous n'avons pas réussi à identifier ces modifications mais elles sont certainement dues à la production de la protéine à faible température sur des temps relativement longs.

Nous avons donc décidé d'étudier un autre protocole de culture nécessitant un temps de culture plus faible.

3. Production et purification de l'apo-myoglobine de cachalot fonctionnelle

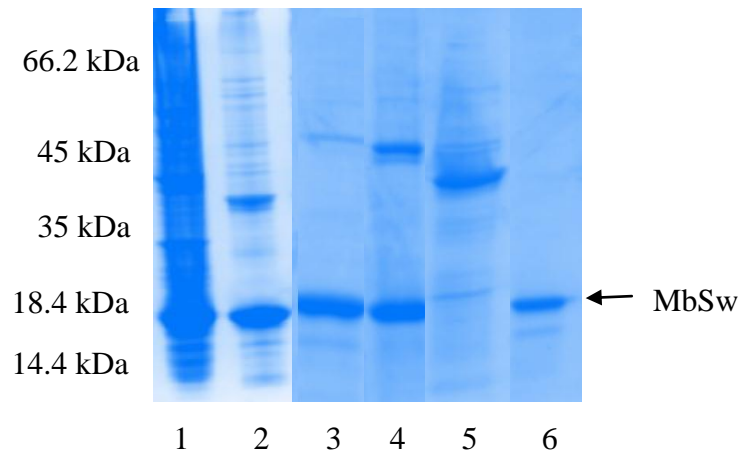
Nous avons dans la littérature un protocole^{169,171} de production et de purification de la myoglobine de cachalot sur des durées plus faible ce qui entraîne la formation de corps d'inclusion, c'est-à-dire que la myoglobine se trouve sous forme précipitée insoluble dans les cellules. D'une manière générale on essaye d'éviter la formation de corps d'inclusion en biochimie afin d'avoir accès à une protéine soluble et éviter les étapes de renaturation potentiellement néfastes à la protéine. Ce constat ajouté au fait que la dernière étape de purification de ce protocole est une purification par HPLC avec une colonne non disponible au laboratoire nous avait initialement amené à mettre de côté ce protocole. Cependant au vu des résultats obtenus par un protocole plus doux de production de la protéine nous avons décidé d'appliquer ce protocole en essayant de remplacer la dernière étape de purification par une étape décrite précédemment.

3.1. Production de la myoglobine de cachalot sous forme de corps d'inclusion et purification

Les cellules d'*Escherichia Coli* ont été transformées avec le même plasmide que précédemment mais les conditions de culture ont été modifiées puisque l'induction à l'IPTG se fait uniquement pendant 5 h à 37°C. Dans ces conditions de culture, la myoglobine est surexprimée dans des corps d'inclusion c'est-à-dire sous forme insoluble.

Une fois les cellules extraites et lysées, les corps d'inclusion sont resolubilisés par sept étapes successives d'extractions par une solution de TFA 0.1% sous sonication puis le milieu d'extraction de la myoglobine est échangé par 2 étapes de dialyses successives, d'abord par un tampon Tris/acétate pH 5.5 20 mM puis par le tampon de travail Tris/HCl 50 mM pH 7.5. Ces dialyses successives permettent un repliement progressif de la myoglobine puisqu'on sait que la myoglobine est complètement dépliée à pH < 2 et parfaitement repliée à pH 7.

Le gel SDS-PAGE des protéines obtenues lors des différentes étapes de purification est présenté figure 78. Nous pouvons voir sur la deuxième colonne que la protéine est bien présente sous forme de corps d'inclusion et sur la troisième qu'une étape de sonication permet de la resolubiliser à pH acide. Après six sonications successives la fraction insoluble ne contient plus de myoglobine (colonne 5) et les deux dialyses successives des protéines solubles après sonications permettent d'obtenir la myoglobine sous forme soluble à pH 7 (colonne 6).



- 1 : surnageant avant lyse des cellules
- 2 : corps d'inclusion
- 3 : protéines solubles après une sonication
- 4 : protéines insolubles après une sonication
- 5 : protéines insolubles après 6 sonications
- 6 : protéines solubles après 6 sonications et dialyse contre le tampon Tris/acétate 20mM pH5.5

Figure 78. Gel SDS-PAGE 15% en conditions dénaturantes présentant les protéines obtenues après les différentes étapes de purification.

On obtient au final après concentration environ 50mg de protéine pour 2L de culture. Dans certains cas, on observe une protéolyse de la protéine avec l'apparition sur gel SDS-PAGE d'une bande de plus faible masse (légèrement visible en position 6 sur le gel figure 78). Cette protéine peut alors être séparée de l'apo-myoglobine par colonne d'exclusion stérique (Sephadex 75). Les rendements de cette dernière étape varient suivant le pourcentage de protéines contaminantes avec au minimum 50% de rendement, la protéine obtenue après cette étape de purification possédant les mêmes propriétés et caractéristiques que lorsque cette dernière étape n'est pas nécessaire.

3.2. Analyse de la protéine obtenue

La protéine obtenue est parfaitement incolore et son spectre d'absorbance UV-Visible ne possède pas de bande autour de 409 nm caractéristique de la présence d'hème résiduel comme on peut le voir figure 79. La protéine obtenue ne possède donc pas son cofacteur naturel qui n'a pas pu être incorporé lors de la culture du fait de la formation de corps d'inclusion.

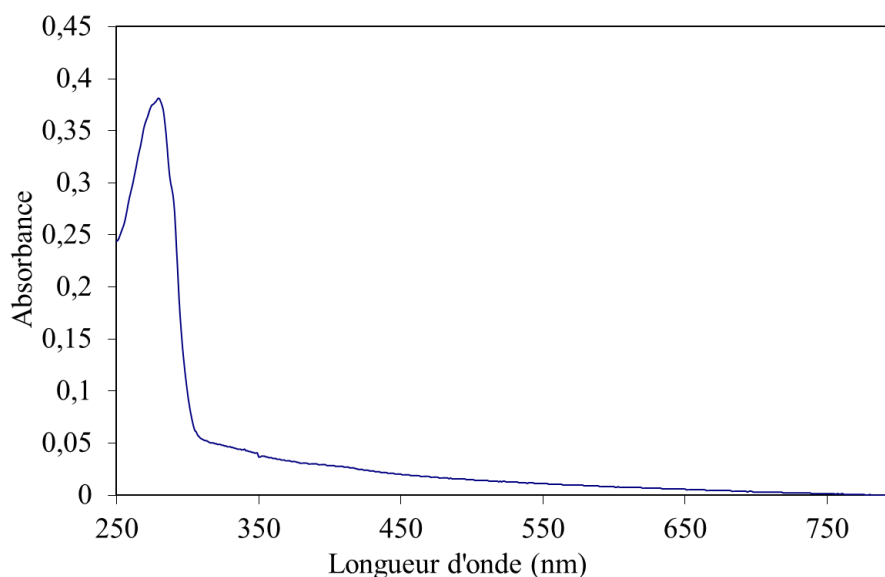


Figure 79. Spectre UV-Visible de l'apo-myoglobine de cachalot après purification (30 μ M dans Tris/HCl 50mM pH 7.2).

De plus, l'analyse par spectrométrie de masse en condition dénaturante a permis de confirmer que la protéine n'a pas subi de modifications chimiques de sa structure primaire et que la masse obtenue est en accord avec celle attendue pour la myoglobine de cachalot (17331 Da).

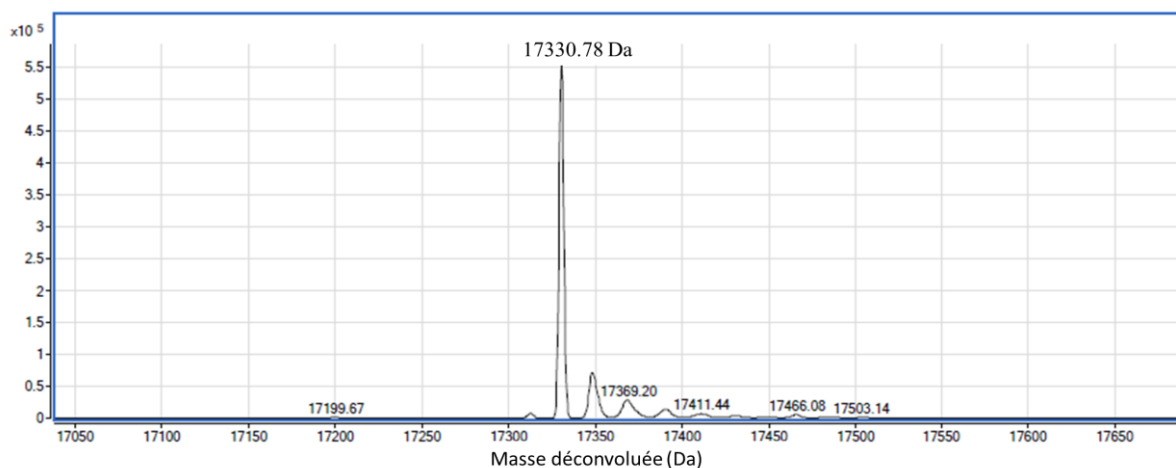


Figure 80. Spectre de masse en condition dénaturante déconvolué de l'apo-myoglobine de cachalot.

Enfin l'analyse du dichroïsme circulaire dans l'UV d'une solution d'apo-myoglobine a permis de vérifier que la protéine a une structure tertiaire majoritairement constituée d'hélices alpha (figure 81) et donc en accord avec la structure tertiaire de la forme N de la myoglobine avec 6 des 7 hélices alpha déjà structurées. Ce spectre est également en accord avec les spectres présents dans la littérature pour l'apo-myoglobine de cachalot.¹⁷²

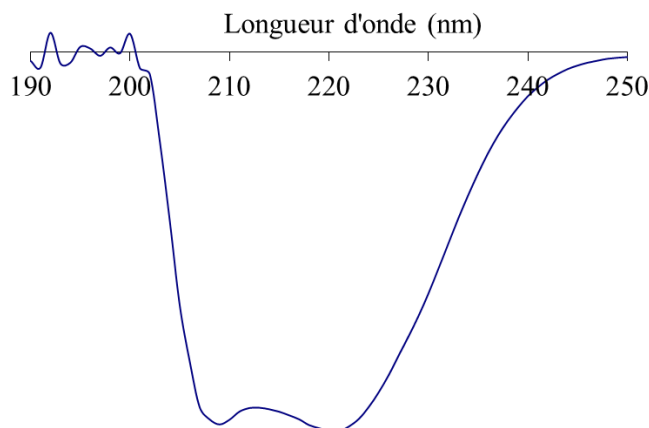


Figure 81. Spectre de dichroïsme circulaire d'une solution d'apo-myoglobine de cachalot (3 μ M dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.5).

3.3. Reconstitution de l'holo-myoglobine

Afin de vérifier que la protéine ainsi surexprimée est bien fonctionnelle, c'est-à-dire qu'elle est capable d'insérer correctement un hème dans sa cavité protéique, nous avons procédé à sa reconstitution en présence de deux équivalents d'hémine commerciale. Pour cela nous avons ajouté deux équivalents de complexe à la solution. Après incubation, nous avons éliminé l'excès de complexe par chromatographie d'exclusion stérique. La solution protéique obtenue après purification est rouge et a un spectre UV-Visible caractéristique de l'holo-myoglobine. En effet comme on peut le voir figure 82, le maximum de la bande de Soret du fer est décalé vers les longueurs d'onde plus grandes, affinée et plus intense. On retrouve ainsi un rapport d'environ 5 entre les coefficients d'extinction molaire à 280 nm et 409 nm.

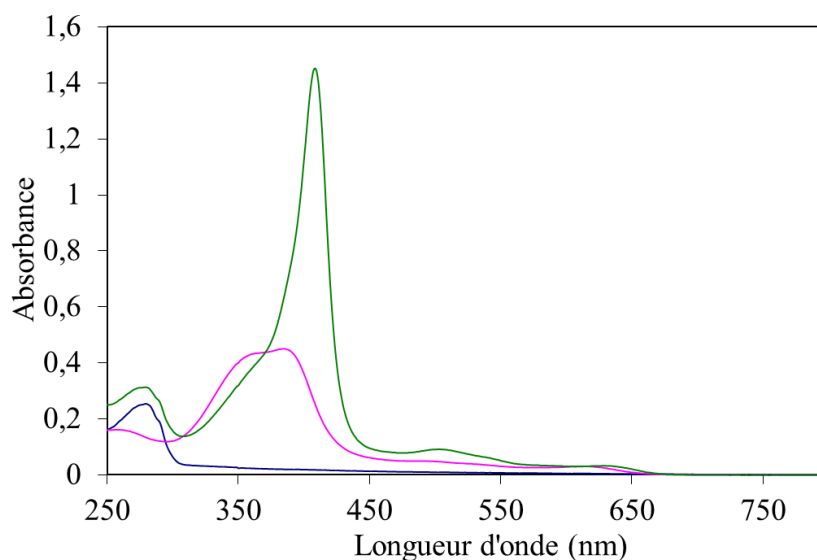


Figure 82. Spectre UV-Visible de l'apo-myoglobine (bleu) de l'hème en solution (rose) et de l'holo-myoglobine reconstituée (vert) (concentrations protéique et hémique de 300 μ M dans du tampon 50mM Tris/HCl pH7).

L'insertion d'un seul équivalent d'hème par protéine a été confirmée par titration suivie par spectroscopie UV-Visible. En effet comme nous venons de le voir le coefficient d'extinction molaire de l'hème varie de manière considérable selon que l'hème est fixé ou non dans la protéine. Ainsi la mesure de l'absorbance à 409 nm de la solution en fonction du nombre d'équivalents d'hèmes ajoutés représentée figure 83 permet de savoir à quel moment le complexe ajouté n'est plus inséré dans la protéine.

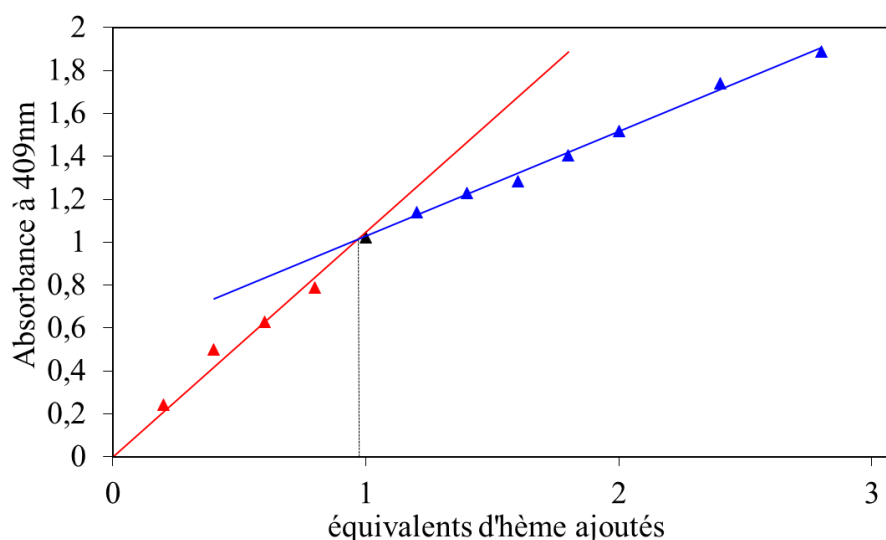


Figure 83. Absorbance à 409 nm d'une solution de myoglobine en fonction du nombre d'équivalent d'hème ajouté à la solution. Conditions de mesure et de régression linéaire dans la partie Matériels et Méthodes.

De plus, l'analyse par dichroïsme circulaire de l'holo-myoglobine reconstituée, mesurée autour de la longueur d'onde d'absorbance de l'hème (409 nm) présente une bande qui montre bien que l'hème est dans un environnement chiral comme on peut le voir figure 84. Le spectre obtenu est de plus en accord avec les données présentes dans la littérature.¹⁷³

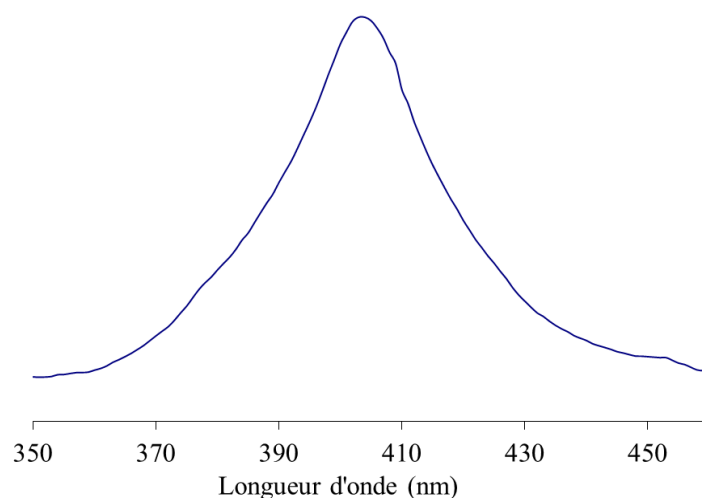


Figure 84. Spectre de dichroïsme circulaire d'une solution d'holo-myoglobine de cachalot reconstituée (20 μ M dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.5).

Enfin la mesure du dichroïsme circulaire dans la région d'absorbance des acides aminés prouve que la protéine est repliée correctement avec une majorité d'hélice alpha comme c'était déjà le cas pour la forme apo de la protéine. L'insertion de l'hème modifie donc peu la structure tertiaire ainsi que les structures secondaires de la protéine (comme cela était attendu puisque comme on l'a vu précédemment seule l'hélice F se structure autour de l'hème). Cette structuration supplémentaire peut être observée par la présence d'un signal plus fort autour de 200 nm comme on peut le voir sur le spectre figure 85. Ce spectre est en accord avec les données présentes dans la littérature.¹⁷⁴

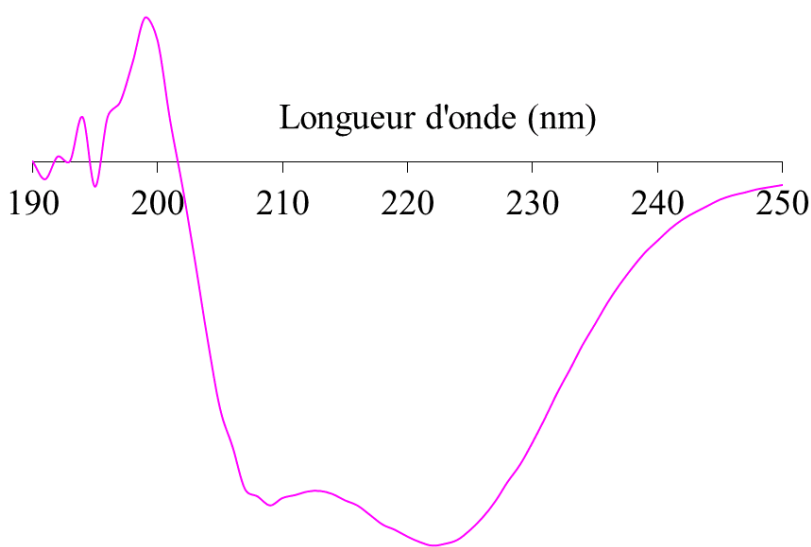


Figure 85. Spectre de dichroïsme circulaire d'une solution d'holo-myoglobine reconstituée (5 μ M dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.5).

4. Conclusion

Après un long travail de mise au point du protocole expérimental m'ayant permis de maîtriser les différentes techniques de biochimie nous maîtrisons maintenant la production et la purification de la myoglobine de cachalot. La protéine obtenue va nous permettre de mettre au point les protocoles de préparation et d'étude des différents hybrides à partir de complexes de cobalt qui seront présentés dans le chapitre III. Nous avons également à notre disposition trois autres protéines via des collaborations que nous pourrions utiliser afin de modifier l'environnement des complexes de cobalt.

- CHAPITRE III -

Préparation et caractérisation des hybrides

Dans le chapitre II, nous avons présenté les différents complexes ainsi que les enveloppes protéiques utilisés. Ce chapitre s'intéressera donc à la formation et à l'étude des hybrides formés à partir de complexes de cobalt et d'hémoprotéines, plus particulièrement avec la myoglobine et l'hème oxygénase. Les hybrides obtenus avec ces deux protéines ont des caractéristiques spectrales très similaires que ce soit en spectroscopie UV, en dichroïsme circulaire mais également en résonance paramagnétique électronique (RPE) ou en spectrométrie d'absorption aux rayons X (XAS).¹⁷⁵ Cette ressemblance nous permet de comparer les résultats obtenus par ces méthodes spectroscopiques avec la myoglobine à ceux obtenus avec l'hème oxygénase. De plus, nous avons pu constater tout au long de l'étude que la formation et la caractérisation des hybrides étaient dépendantes de la nature du complexe mais peu de la nature de la protéine. Dans ce chapitre nous nous intéresserons donc dans un premier temps à la préparation générale des hybrides. Nous détaillerons ensuite leur caractérisation en les regroupant suivant la nature du complexe incorporé dans la protéine.

1. Préparation générale des hybrides

A l'instar de la reconstitution de l'holo-myoglobine présentée au chapitre II, les hybrides sont formés, de manière générale, par incubation de plusieurs équivalents de complexe avec la protéine. La purification se fait ensuite par colonne d'exclusion stérique permettant de séparer les petites molécules (le complexe libre) des plus grosses (de nature protéique).

1.1. La myoglobine et les complexes de nickel

Au début de l'étude, nous avons comparé l'affinité des apo-hémoprotéines, et notamment de la myoglobine, avec les catalyseurs de production d'hydrogène à base de nickel et de cobalt présentés dans le chapitre II. Pour cela nous avons étudié la formation d'hybrides entre la myoglobine et le complexe diimine dioxime de nickel $[\text{Ni}\{(\text{MO})(\text{MOH})\text{pn}\}\text{Cl}]$ ainsi qu'avec le complexe de cobalt similaire $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$ dont les structures sont représentées figure 86.

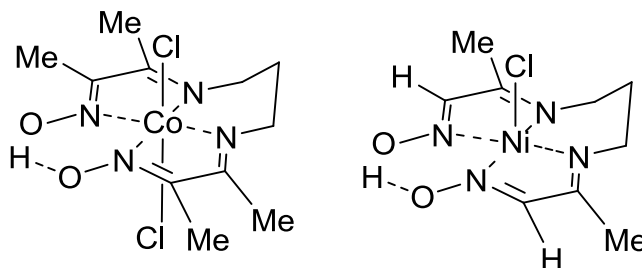


Figure 86. Structures du complexe $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$ à gauche et du complexe $[\text{Ni}\{(\text{MO})(\text{MOH})\text{pn}\}\text{Cl}]$ à droite

Une méthode particulièrement efficace d'analyse de la formation d'hybrides entre une protéine et un complexe inorganique est la spectroscopie UV-Visible. Les spectres UV-visible du complexe $[\text{Ni}\{(\text{MO})(\text{MOH})\text{pn}\}\text{Cl}]$, de la protéine et de la fraction protéique après élimination de l'excès de complexe n'ayant pas interagi avec la myoglobine sont représentés figure 87.

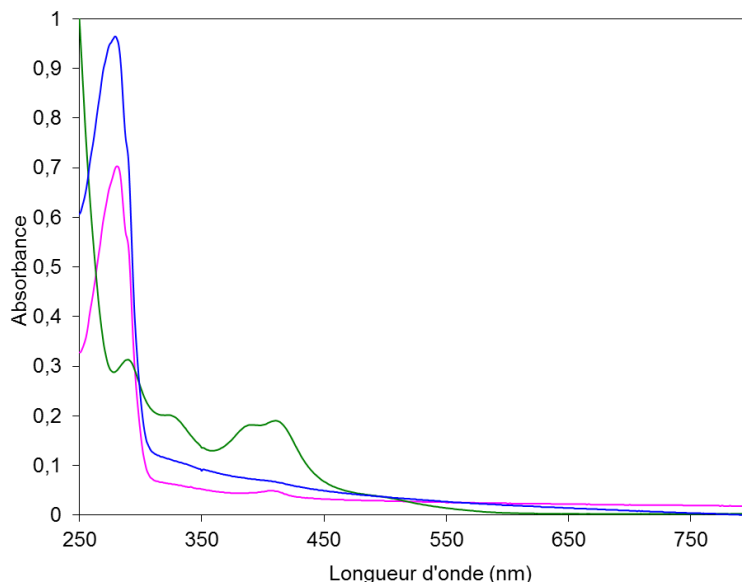


Figure 87. Spectres UV-Visible de l'apo-myoglobine (bleu), de $[\text{Ni}\{(\text{MO})(\text{MOH})\text{pn}\}\text{Cl}]$ (vert) et de la fraction protéique après élimination du complexe libre (rose) à 75 μM dans du tampon Tris/HCl 50 mM, NaCl 100 mM pH 7.5

La fraction protéique obtenue après purification a un spectre UV-visible très similaire à celui de l'apo-myoglobine, montrant une capacité négligeable sinon nulle de l'apo-myoglobine de fixer ce complexe de nickel. La faible bande que l'on peut observer autour de 300 nm correspond à la présence résiduelle de complexe du fait d'une mauvaise séparation des fractions. En effet, le profil d'élution sur colonne d'exclusion stérique (NAP 10) d'un complexe inorganique et celui d'une protéine forment deux gaussiennes qui se chevauchent légèrement. La séparation étant manuelle il est possible qu'une très faible quantité de complexe non fixé soit dans la fraction protéique mais cette proportion reste très faible comme on peut le voir par la faible absorbance observée dans ce cas-là à 300 nm. La myoglobine n'a pas interagi non plus avec le complexe de nickel $[\text{Ni}\{(\text{MO})(\text{MOH})\text{pn}\}]\text{ClO}_4$ (figure 59), dont le contre-ion perchlorate n'est pas lié au nickel en solution, montrant que l'absence d'interaction avec la protéine n'est pas due à l'occupation préalable du site axial sur le complexe de nickel.

En appliquant le même protocole au complexe $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$ nous obtenons un résultat différent puisque, comme on peut le voir figure 88, le spectre UV-visible de la fraction protéique après purification est nettement différent de celui de la myoglobine.

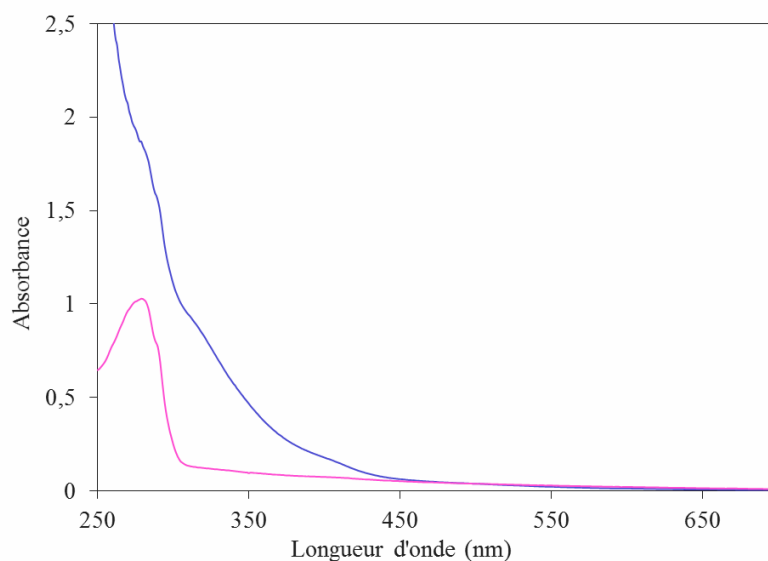


Figure 88. Spectres UV-visible de l'apo-myoglobine (rose) et de la fraction protéique obtenue après élimination de l'excès de complexe $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$ (bleu) ($80\ \mu\text{M}$ dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH7)

Ces résultats nous permettent de confirmer que les complexes de cobalt, certainement de par leur affinité avec les ligands azotés, via leur site de coordination axial, sont des bons candidats pour interagir avec la myoglobine et d'autres hémoprotéines. De plus, la séparation du complexe de nickel de la fraction d'apo-myoglobine confirme également que l'utilisation d'une colonne d'exclusion stérique (aussi appelée colonne de dessalage) permet de séparer avec une résolution satisfaisante les protéines des complexes inorganiques et qu'il n'existe pas d'interaction non-spécifique entre ce type de complexes et la protéine.

Nous avons observé de la même manière des interactions entre l'hème oxygénase et les complexes de cobalt alors qu'il n'y en a pas eu entre cette protéine et le complexe de nickel $[\text{Ni}\{(\text{MO})(\text{MOH})\text{pn}\}\text{Cl}]$.

Comme nous venons de le voir, la spectroscopie UV-visible est une méthode de choix pour analyser une protéine hybride renfermant un complexe inorganique. L'espèce ainsi formée possède à la fois des caractéristiques UV-visible de la protéine (absorbance à 280 nm des acides aminés aromatiques) et du complexe inorganique inséré (bandes de transfert de charge et transition d-d).

Nous allons donc nous intéresser dans un premier temps aux signatures spectrales des trois complexes de cobalt avec lesquels nous avons travaillé par la suite.

1.2. Les complexes de Co(II)

Les complexes de cobalt(II) ont des caractéristiques spécifiques de leurs degrés d'oxydation. Ainsi les cobaloximes $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ à l'état d'oxydation + II, dont les spectres UV-visible ainsi que les structures sont représentés figures 89 et 90 respectivement, ont des signatures spectrales assez similaires.

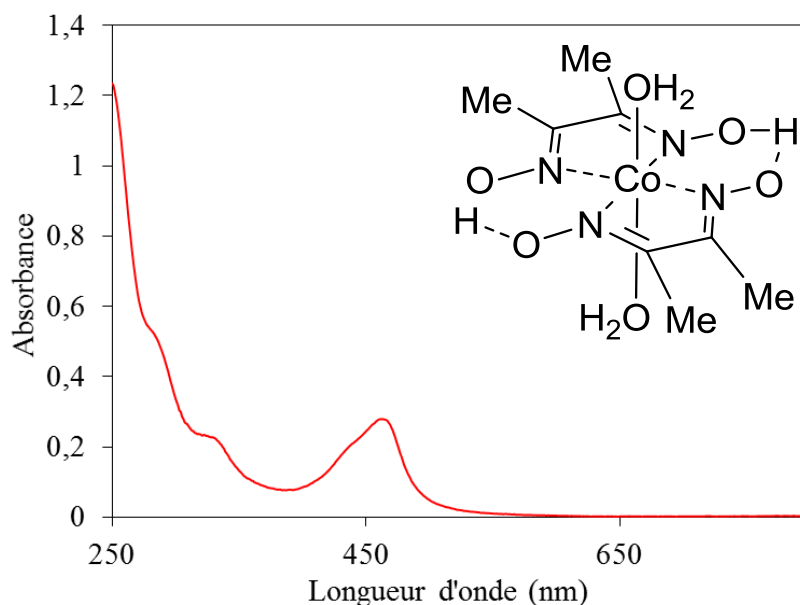


Figure 89. Spectre UV-visible de $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ à 80 μM dans du tampon Tris/HCl 50mM pH 7 et sa structure.

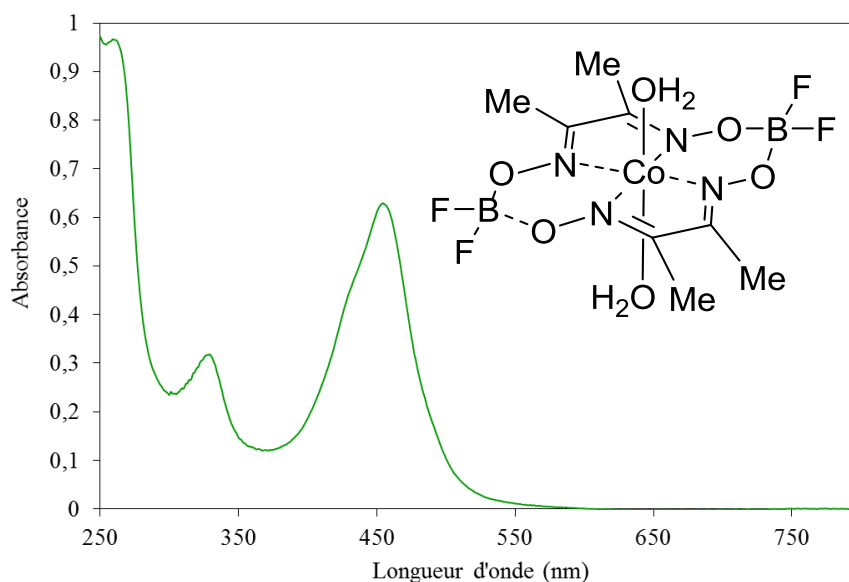


Figure 90. Spectre UV-visible de $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ à 200 μM dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7 et sa structure.

On constate donc que les spectres UV-visible de ces complexes présentent une bande d'absorbance associée aux transitions $d-d^{176}$ autour de 460 nm avec un maximum à 465 nm pour $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et à 457 nm pour $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (figure 89 et 90

respectivement). Les coefficients d'extinction molaire à ces longueurs d'onde respectives sont quasiment identiques puisque nous avons pu calculer une valeur à 465 nm de $3.13 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pour la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et une valeur à 457 nm de $3.11 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pour la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$.

Les hémoprotéines utilisées comme enveloppes protéiques de ces complexes possèdent au moins une histidine libre comme ligand potentiel du cobalt. Comme les caractéristiques spectrales des complexes dépendent de la sphère de coordination du métal nous avons étudié l'influence de la présence d'imidazole (permettant de mimer l'histidine) sur les spectres UV-visible de ces espèces et plus particulièrement sur la bande d'absorbance autour de 460 nm. Nous avons pour cela ajouté différents équivalents d'imidazole (0, 1, 2 et 5 équivalents) dans une solution de complexe ($[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ pour la figure 91 et $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ pour la figure 92) et nous avons enregistré le spectre UV-visible de ces solutions.

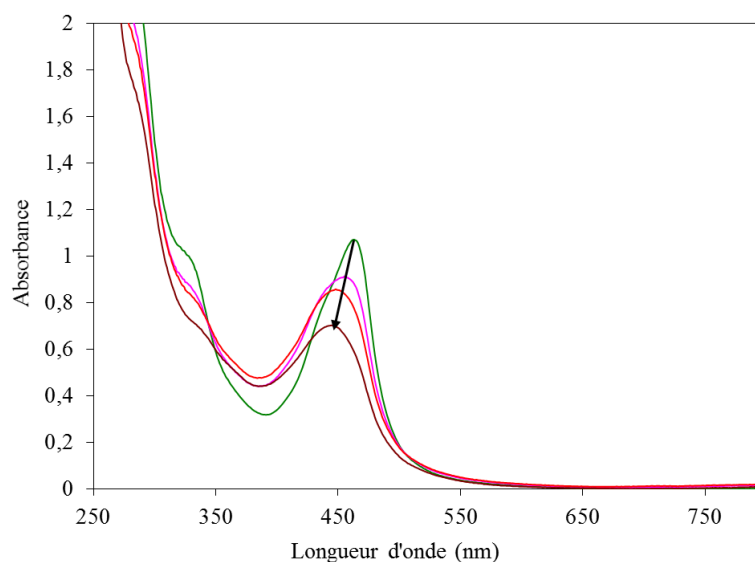


Figure 91. Spectre UV-Visible de $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ ($550 \mu\text{M}$ dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 8) en fonction d'un ajout croissant d'imidazole (0, 1, 2 et 5 équivalents).

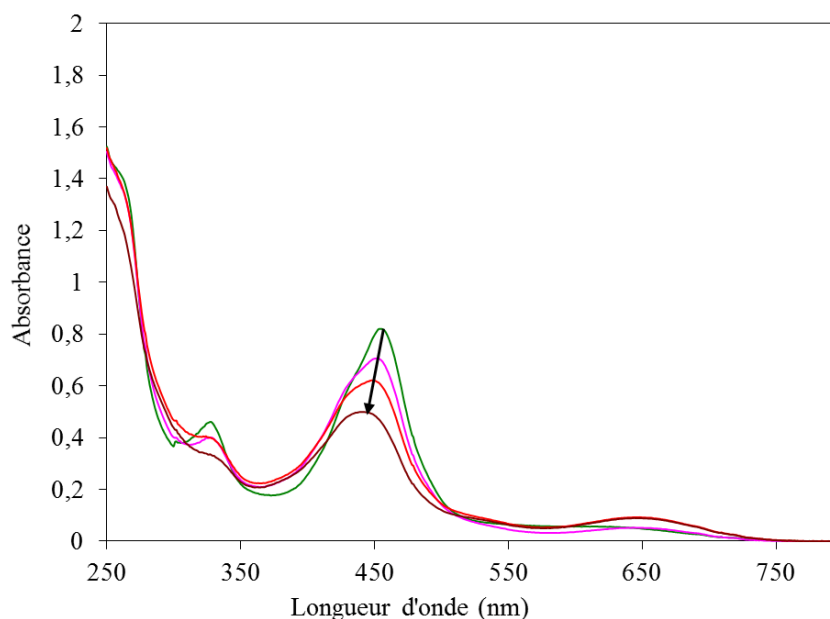


Figure 92. Spectre UV-Visible de $[Co(dmgbF_2)_2(H_2O)_2]$ (600 μM dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 8) en fonction d'un ajout croissant d'imidazole (0, 1, 2 et 5 équivalents).

Pour les deux complexes nous avons pu observer une influence de l'imidazole sur le spectre UV-visible du complexe. La présence d'imidazole diminue l'intensité de la bande caractéristique du Co(II) et décale son maximum vers des longueurs d'onde plus faibles. Nous n'avons pas étudié les spectres UV-visible de ces complexes en présence d'un plus grand excès d'imidazole. Ainsi, malgré la diminution observée de l'intensité, la bande caractéristique du Co(II) autour de 460 nm devrait encore être visible lorsque le complexe est inséré dans la protéine.

1.3. Les complexes de Co(III)

Pour les cobaloximes et les complexes de cobalt diimine dioxime à l'état cobalt(III), on observe uniquement une zone d'absorbance entre 250 nm et 450 nm comme on peut le voir sur le spectre de $[Co\{(DO)(DOH)pn\}Cl_2]$ figure 93 ou encore sur le spectre UV visible représenté figure 94 d'un autre complexe de cobalt(III), $[Co(gh)_2pyCl]$ soluble dans l'eau. Il s'agit alors de bandes de transfert de charge Ligand \rightarrow Métal.

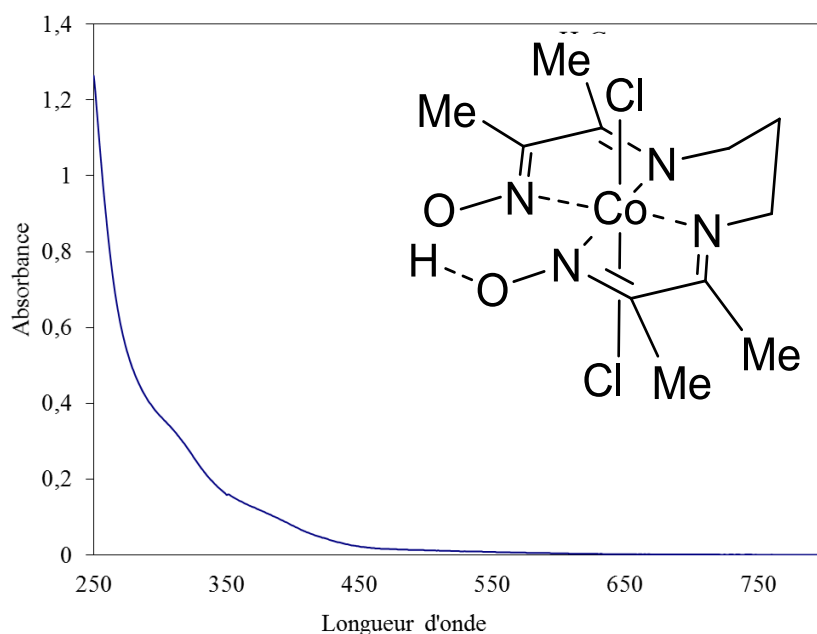


Figure 93. Spectre UV-visible de $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$ à $82.5 \mu\text{M}$ dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7 et sa structure.

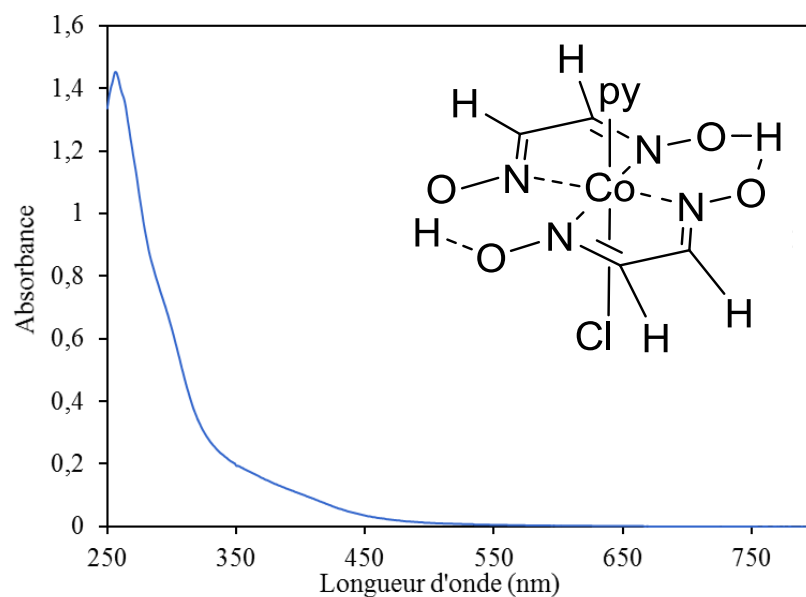


Figure 94. Spectre UV-visible de $[\text{Co}(\text{gh})_2\text{pyCl}]$ à $68 \mu\text{M}$ dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7 et sa structure.

1.4. Conclusion

Nous avons donc montré que la myoglobine interagit particulièrement bien avec les complexes de cobalt alors qu'elle n'a aucune affinité avec des complexes de nickel similaires. Alors que les cobaloximes $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ ont des propriétés spectroscopiques relativement proches, les hybrides obtenus avec ces deux complexes ont montré certaines différences qui nous amèneront à les traiter séparément par la suite.

2. Caractérisation des hybrides Mb/HO1-[Co(dmgBF₂)₂(H₂O)₂]

D'une manière générale, l'étude des hybrides peut se diviser en trois temps. Dans un premier temps la formation de l'hybride est analysée par spectroscopie UV-visible. Ensuite nous avons étudié ses propriétés et notamment sa stabilité en solution. Enfin, nous avons utilisé différentes méthodes d'analyses (XAS, RPE, simulation...) afin de mieux définir l'environnement du complexe inorganique dans la protéine.

2.1. Spectroscopie UV/Visible et quantification du cobalt

La formation d'un hybride entre la cobaloxime [Co(dmgBF₂)₂(H₂O)₂] et la myoglobine (Mb) ainsi qu'avec l'hème oxygénase 1 de rat (HO1) peut être confirmée par spectroscopie UV/Visible une fois la fraction protéique purifiée de l'excès de complexe par colonne d'exclusion stérique.

Comme on peut le voir figure 95, l'hybride Mb-[Co(dmgBF₂)₂(H₂O)₂] a une signature spectroscopique spécifique. En effet, comme cela est également le cas lors de la formation de l'holo-myoglobine, le spectre UV-Visible obtenu n'est pas une combinaison linéaire des spectres UV-Visible de la protéine et du complexe en solution.

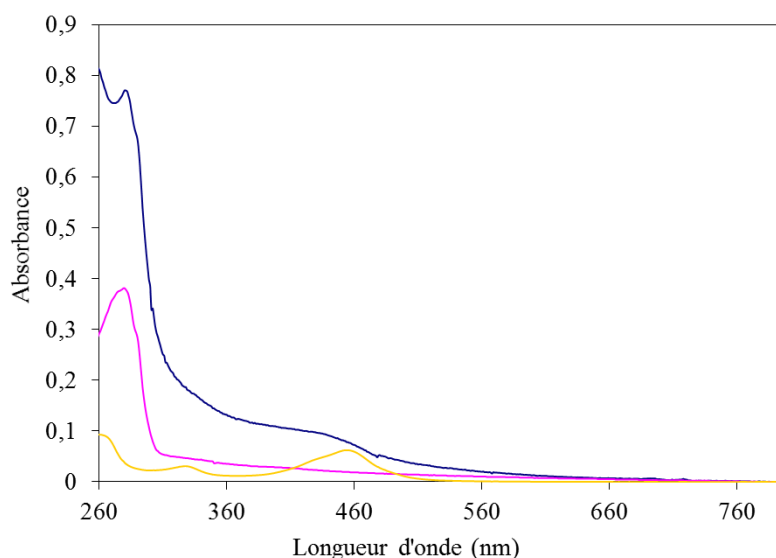


Figure 95. Spectres UV-Visible de l'hybride Mb-[Co(dmgBF₂)₂(H₂O)₂] (bleu), apo-myoglobine (rose) et [Co(dmgBF₂)₂(H₂O)₂] (jaune) (30 μ M dans du tampon Tris 50 mM pH 7.5).

On peut associer la présence de la protéine et du complexe inorganique à deux zones d'absorbance distinctes. En effet, la présence de la protéine peut être associée à la bande d'absorbance à 280 nm de l'hybride alors que la présence du complexe peut être associée à la zone d'absorbance autour de 450 nm. Certaines caractéristiques du spectre UV-visible de

l'hybride ne sont cependant pas explicables par la simple addition des deux spectres UV-visible du complexe et de la protéine. En effet la bande à 280 nm est beaucoup plus intense qu'attendu. De plus, alors qu'en présence d'imidazole on observe une augmentation et un décalage de la bande à 460 nm du cobalt vers les longueurs d'onde plus faibles, cette bande augmente en intensité dans l'hybride. Enfin, l'absorbance observée entre 350 nm et 400 nm n'est pas expliquée par les caractéristiques spectrales de la protéine ou du complexe. L'enveloppe protéique modifie donc le spectre UV-visible du complexe de manière plus marquée que ne le fait la simple coordination d'imidazole en position axiale.

Dans le cas de l'hybride HO1-[Co(dmgBF₂)₂(H₂O)₂], son spectre UV-visible ne correspond pas non plus à l'addition des spectres UV-visible du complexe et de la protéine comme on peut le voir figure 96.

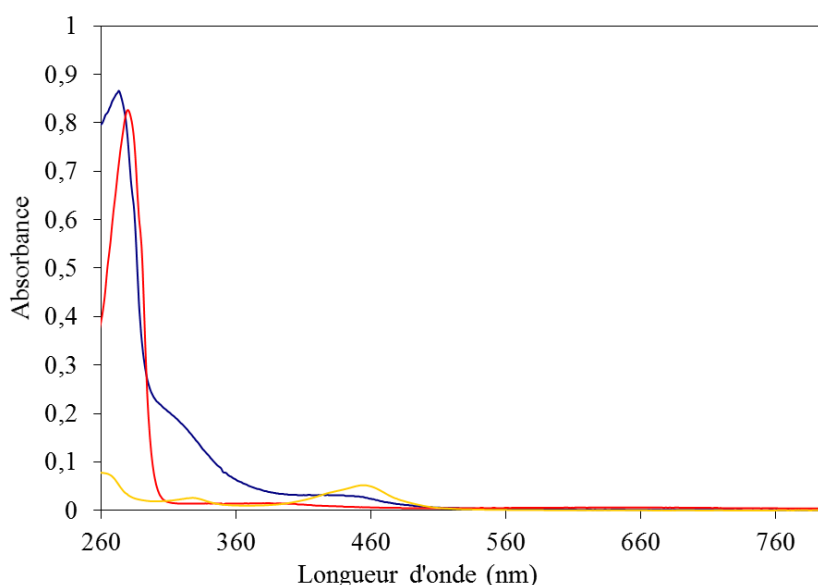


Figure 96. Spectres UV-Visible de l'hybride HO1-[Co(dmgBF₂)₂(H₂O)₂] (bleu), apo-HO1 (rouge) et [Co(dmgBF₂)₂(H₂O)₂] (jaune) (25 μ M dans du tampon Tris 50 mM pH 7.5).

La contribution de la protéine dans le spectre UV-visible dans le cas de l'hème oxygénase est plus importante car le coefficient d'extinction molaire à 280 nm de l'hème oxygénase 1 de rat est plus important que celui de la myoglobine de cachalot (32890 M⁻¹cm⁻¹ pour HO1 contre 15470 M⁻¹cm⁻¹ pour MbSw¹⁷⁷). Pour la bande d'absorbance à 460 nm, attribuée aux transitions d-d de l'ion cobalt(II) on observe bien une diminution et un décalage vers les longueurs d'onde plus faible pouvant être attribué à la coordination axiale d'un motif imidazole d'une histidine de la protéine. On voit cependant apparaître sur le spectre UV-visible de l'hybride une nouvelle bande d'absorbance autour de 320 nm due à la modification des caractéristiques spectrales du complexe inséré dans la protéine.

La présence de cobalt, en stœchiométrie 1 :1 par rapport à la protéine dans ces échantillons, et de protéine dans l'hybride Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] a également été confirmée par dosage protéique (cf. partie Matériels et Méthodes) d'une part et par ICP-MS pour le dosage de cobalt d'autre part. Nous avons alors observé deux comportements différents. Dans un premier cas, les échantillons dont les mesures ont été effectuées directement après passage sur colonne de dessalage présentent une quantité stœchiométrique (un complexe de cobalt pour une protéine avec moins de 5% d'erreur). Il s'agit alors de concentrations plutôt faibles, de l'ordre de la dizaine de micromolaires. Dans un second cas les échantillons ont été ensuite concentrés par centrifugation sur membrane de 3 kDa de taille de coupure retenant donc que les molécules plus grosses. Ils possèdent alors une quantité sous-stœchiométrique de cobalt pouvant aller jusqu'à 30% de perte pour des concentrations finales en protéine autour de 1 mM et jusqu'à 60% de perte pour des concentrations finales en protéine autour de 2 mM. Cet écart a été expliqué par la perte de complexe lors de la concentration de la protéine due aux contraintes induites lors de la centrifugation et malgré la forte interaction existant entre la myoglobine et la cobaloxime comme on le verra par la suite.

Ce résultat nous a amené par la suite à éviter au maximum les étapes de concentration quand cela était possible (c'est-à-dire pour toutes les études sauf les études en résonnance paramagnétique électronique et les tentatives de cristallogénèse pour lesquelles une concentration de l'ordre du millimolaire est nécessaire). Typiquement, la préparation des hybrides se fait à partir de solutions d'apo-myoglobine de concentration de l'ordre de la centaine de micromolaire pour une concentration en hybride après purification de l'ordre de 50 µM. Les études menées afin de préparer les hybrides à partir de solutions plus concentrées en protéine ont abouti à une précipitation de la protéine lors de l'ajout de la solution de complexe.

2.2. Caractérisation de l'état d'agrégation et étude de la stabilité en solution

2.2.1. Caractérisation de l'état d'agrégation de l'hybride Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂]

Afin de compléter cette étude nous nous sommes intéressés à la forme en solution de l'hybride. En effet il est intéressant de savoir si l'hybride forme une espèce monomérique en solution, comme l'apo-myoglobine et l'holo-myoglobine, ou s'il forme une espèce dimérique ou multimérique, les complexes servant de motifs d'assemblage entre deux protéines. Cette

information est importante pour mieux comprendre son interaction en solution avec d'autres partenaires par exemple lors des études catalytiques. Pour cela nous avons utilisé une colonne d'exclusion stérique préalablement étalonnée avec des protéines parfaitement globulaires de masses moléculaires différentes : lorsque la protéine présente une structure globale globulaire, son volume d'élution est en effet directement proportionnel à sa masse molaire. Ceci est le cas pour l'apo-myoglobine et l'holo-myoglobine. On a pu confirmer par cette méthode que c'est également le cas pour l'hybride Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] puisque son temps d'élution, dans les mêmes conditions, est similaire à celui de l'apo-myoglobine et de l'holo-myoglobine. La présence du complexe de cobalt ne modifie donc pas la structure globale de la protéine et cette dernière est sous forme monomérique.

2.2.2. Calcul de la constante de dissociation associée à l'hybride Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂]

Un point majeur dans l'analyse d'hybrides formés à partir de liaison de coordination entre un métal et un acide aminé est la détermination de sa stabilité en fonction de la concentration en hybride. En effet, s'il y a un équilibre de dissociation entre le complexe et la protéine (avec une constante de dissociation K_d) il est nécessaire de travailler à des concentrations supérieures à une concentration limite (souvent fixée à 10×K_d) afin de s'assurer de rester dans le domaine de stabilité de l'hybride où plus de 90% du complexe est coordonné à la protéine.

Nous avons donc dans un premier temps étudié l'équilibre entre la myoglobine et la cobaloxime par fluorimétrie selon une méthodologie déjà bien décrite par Dana Stan et ses collaborateurs en 2009.¹⁷⁸⁻¹⁸¹

La détermination d'une constante de dissociation par cette méthode est basée sur l'étude de l'influence de la cobaloxime sur la fluorescence naturelle des tryptophanes de la protéine (excitation à 280 nm pour un maximum d'émission autour de 330 nm). En effet, si le complexe est suffisamment proche des résidus tryptophane, il absorbe les photons émis par ces derniers et il y a alors extinction de leur fluorescence. La myoglobine possède deux résidus tryptophanes en positions 7 et 14. Ces résidus sont relativement éloignés de la poche hydrophobe comme on peut le voir sur la figure 97.

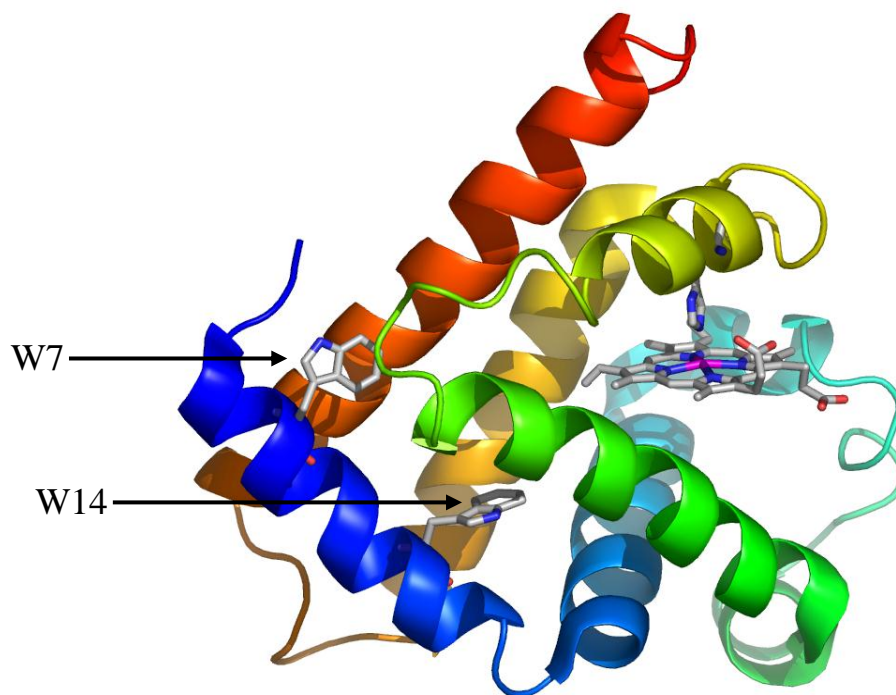


Figure 97. Structure de l'holo-myoglobine de cachalot avec ses deux résidus tryptophanes (W7 et W14).

Cependant, malgré cette distance, on observe une extinction de la fluorescence lors d'un ajout croissant du complexe dans la solution protéique. On a ainsi mesuré la fluorescence de la protéine puis de la solution protéique avec différents équivalents (de 0 à 10 équivalents) de complexe $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$. Certaines courbes de fluorescence sont représentées figure 98.

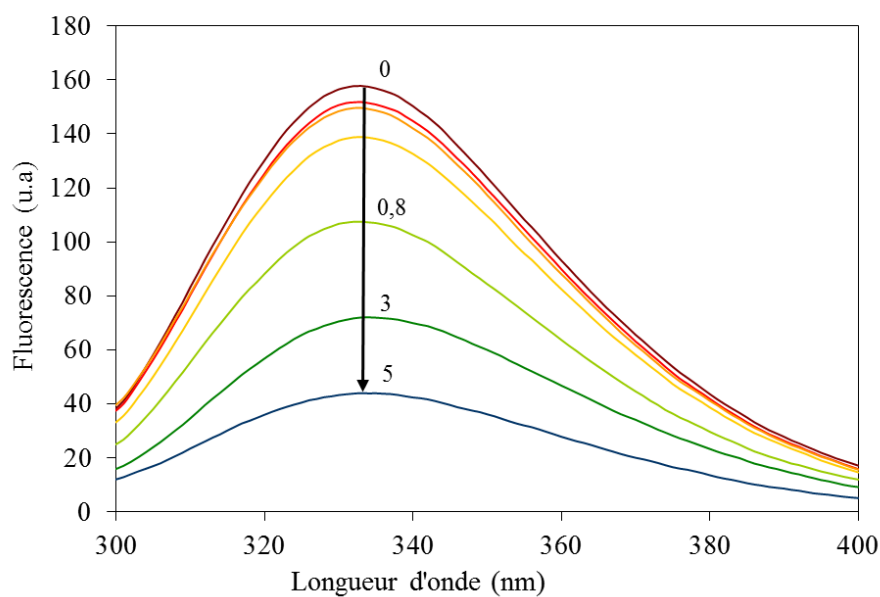


Figure 98. Fluorescence de la myoglobine en fonction d'un ajout croissant de cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (de 0-0.1-0.2-0.5-0.8-3-5 équivalents) à une concentration de 4.6 μM en protéine dans du tampons Tris/HCl 50 mM pH 7.

Puisque dans notre cas la cobaloxime ne possède pas de fluorescence intrinsèque, la fluorescence de la solution est directement proportionnelle à la concentration d'apo-protéine. Ainsi, s'il existe un équilibre entre l'hybride et l'apo-protéine, on observe la formation d'un plateau de fluorescence correspondant à l'équilibre entre ces deux formes.

Dans notre cas, même à 10 équivalents de complexe, le plateau n'est pas atteint et cela coïncide avec un signal très faible. Une constante de dissociation de 8 μM ($\pm 2 \mu\text{M}$) associée à l'équilibre observé a quand même pu être calculée par une méthode de régression linéaire décrite par Stan et ses collaborateurs.¹⁸¹ Or cette valeur est bien plus faible que la valeur de la constante de dissociation entre l'hème et l'histidine dans l'holo-myoglobine qui peut être estimée être de l'ordre de 0.1-1 mM.¹⁶⁰ Cependant, de par l'existence d'autres interactions entre l'hème et l'enveloppe protéique, la constante d'affinité globale est de l'ordre de 10^{14} M^{-1} . De plus comme on l'a vu au chapitre II, l'interaction de l'histidine 93 de l'apo-myoglobine avec l'hème entraîne la structuration de l'hélice rendant la réaction d'interaction entre l'hème et l'apo-myoglobine irréversible.^{160,161} Il est donc peu probable que la constante de dissociation mesurée de 8 μM corresponde à la constante de stabilité de nos hybrides.

Nous avons donc décidé d'étudier le phénomène d'insertion de l'hémine dans la cavité protéique de la myoglobine après formation préalable de l'hybride afin de savoir si la formation de l'hybride est un équilibre ou une réaction irréversible.

2.2.3. Etude de l'insertion de l'hème dans l'hybride Mb-[Co(dmgBF₂)₂(H₂O)₂]

Cette étude peut se faire par spectroscopie UV-Visible car l'hème n'a pas les mêmes propriétés spectrales suivant qu'il est à l'intérieur ou hors de la myoglobine. Nous avons donc mesuré le spectre UV-visible après 4h d'incubation d'une solution d'hybride à 10 μM dans laquelle a été ajouté 1 équivalent d'hème. Ce dernier est représenté en vert figure 99. La comparaison avec le spectre UV-visible de l'holo-myoglobine (en rouge figure 99) et avec celui de l'hème seul en solution (en jaune figure 99) nous permet de confirmer que l'hème ne s'insère pas dans la myoglobine à une concentration de 10 μM au bout de 4 h. En effet, l'hème possède en présence de l'hybride une bande d'absorbance à 390 nm semblable à celle de l'hème en solution et non à celle de l'hème dans l'holo-myoglobine.

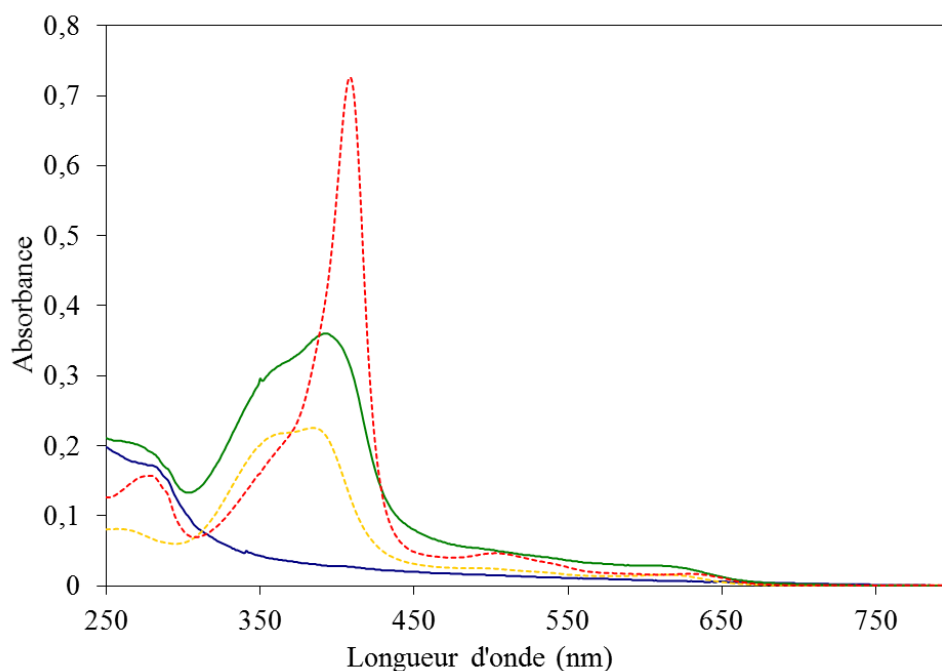


Figure 99. Spectres UV-Visible de l'hème en solution (jaune), de l'holo-myoglobine (rouge), de l'hybride Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] (bleu) et de l'hybride en présence d'hème (vert) (à 10 μ M dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.5 – spectres stables pendant au moins 4 h).

Cette étude nous permet d'envisager deux possibilités : La première est que la formation de l'hybride Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] est une réaction réversible avec une constante d'affinité très supérieure à 10^{14} M^{-1} , ce qui est peu probable car le complexe de cobalt est fixé à la protéine uniquement via la coordination d'une histidine sur le cobalt et que les liaisons faibles pouvant exister entre le complexe et l'environnement protéique ne sont pas optimisées. La deuxième possibilité, la plus probable, est qu'il s'agit d'une réaction irréversible car s'il y avait un équilibre rapide on verrait par spectroscopie UV-visible le déplacement de cet équilibre par incorporation de l'hème dans la myoglobine qui est, elle, un processus irréversible. Ainsi, la constante de 8 μ M mesurée par les études de fluorescence ne peut pas être celle de l'équilibre entre l'apo-myoglobine et la cobaloxime [Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂]. En revanche, elle pourrait correspondre à un équilibre entre l'excès de cobaloxime [Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] et l'hybride Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂]. En effet, de manière similaire, l'holo-myoglobine interagit de manière non spécifique avec l'hème avec une constante de dissociation de l'ordre du μ M.¹⁶⁰

2.2.4. Etude de l'insertion de l'hème dans l'hybride HO1-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂]

Une étude similaire a été réalisée pour les hybrides à base d'hème oxygénase. La formation de l'holo-HO1 est un processus en deux étapes avec dans un premier temps la fixation de l'hème grâce à des interactions électrostatiques avec deux résidus (la lysine 179 et l'arginine 183) puis,

dans un second temps, la structuration de l'hélice proximale avec la coordination de l'histidine 25 au fer de l'hème. Il s'agit, comme dans le cas de l'holo-myoglobine, d'un processus irréversible.¹⁸² Nous avons donc étudié la stabilité de l'hybride HO1-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] en présence d'hème par spectroscopie UV-visible.

Comme on peut le voir sur la figure 100 en vert le spectre UV-visible de l'hybride en présence d'hème présente une bande d'absorbance à 409 nm caractéristique de l'insertion d'un équivalent d'hème dans la protéine. Cependant en comparant l'allure de la bande de Soret de l'hème dans ces conditions avec son allure dans l'holo-HO1 (en rouge) on peut constater que seule une partie de l'hème est insérée dans la protéine.

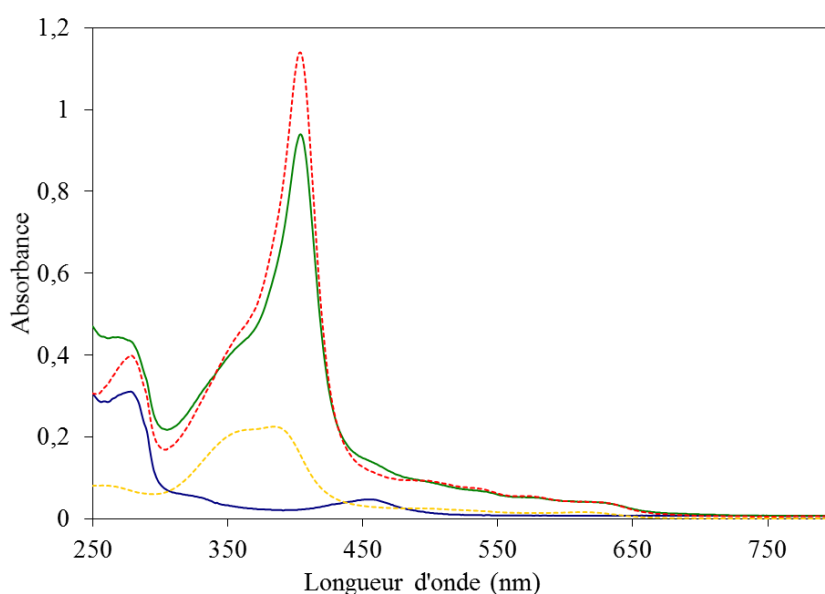


Figure 100. Spectres UV-Visible de l'hème en solution (jaune), de l'holo-HO1 (rouge), de l'hybride HO1-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] (bleu) et de l'hybride en présence d'hème (vert) (à 10 μ M dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.5 – spectres stables pendant au moins 4h).

Afin de connaître la fraction de protéine sous forme holo nous avons utilisé le fait que les coefficients d'extinction molaire de l'hème dans la protéine et en solution sont différents en appliquant la technique utilisée au chapitre II afin de vérifier la coordination d'un unique équivalent d'hème dans la myoglobine. Cette méthode consiste à étudier la variation de l'intensité du maximum de la bande de Soret de l'hème en fonction du nombre d'équivalents d'hème ajoutés. On observe alors deux droites de coefficients directeurs différents dont l'intersection correspond au nombre maximum d'équivalents d'hème ajoutés pouvant s'insérer dans la protéine (figure 101).

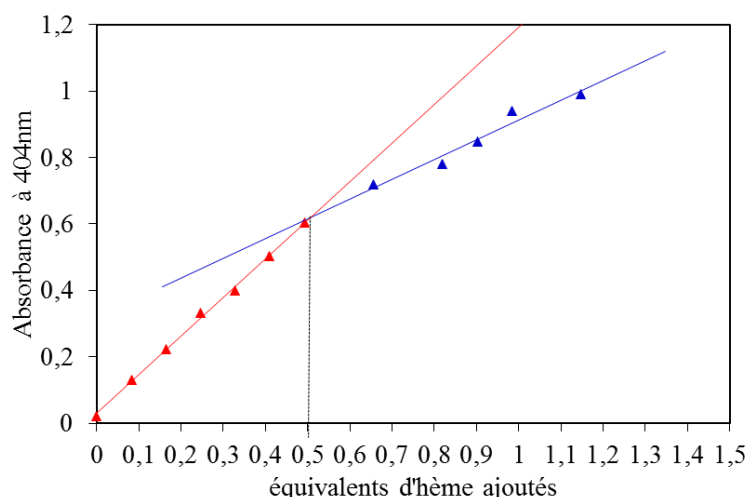


Figure 101. Absorbance à 404 nm d'une solution d'hybride en fonction du nombre d'équivalents d'hème ajoutés à la solution. Conditions de mesure et de régression linéaire dans la partie Matériels et Méthodes.

Alors que dans le cas de l'hème oxygénase cette intersection correspond à l'ajout d'un équivalent d'hème dans la solution, dans le cas de l'hybride HO1-[Co(dmgBF₂)₂(H₂O)₂], l'intersection correspond à l'ajout d'uniquement 0.5 équivalent. Cela signifie que 50 % de la protéine sont coordonnés de manière irréversible à la cobaloxime [Co(dmgBF₂)₂(H₂O)₂] alors que les 50 % restants sont capables d'échanger la cobaloxime par leur cofacteur biologique.

2.2.5. Conclusions

Nous pouvons conclure à la suite de ces deux expériences que la formation de l'hybride Mb-[Co(dmgBF₂)₂(H₂O)₂] est un processus irréversible. La constante calculée à partir des données mesurées par fluorimétrie est donc plus vraisemblablement due à l'existence d'interactions non spécifiques entre les tryptophanes de la protéine et le complexe.

Dans le cas de l'hybride HO1-[Co(dmgBF₂)₂(H₂O)₂] il semble que deux formes soient présentes, la première étant issue d'une réaction irréversible (puisque le signal est stable à 10 μM pendant au moins 4 h) entre la protéine et la cobaloxime et la seconde formée par une réaction réversible dont l'équilibre peut être déplacé par la réaction de la protéine avec l'hème. Cette deuxième forme possède cependant une constante d'équilibre suffisamment élevée pour que la cobaloxime reste associée à la protéine après une colonne d'exclusion stérique.

2.3. Etude spectroscopique sur l'environnement du complexe

Maintenant que nous avons confirmé la formation d'un hybride entre l'apo-myoglobine de cachalot et la cobaloxime [Co(dmgBF₂)₂(H₂O)₂] et que nous savons que cet hybride est stable

quelle que soit la concentration (dans les limites de la précipitation de la protéine), nous nous sommes intéressés à l'environnement du cobalt dans la protéine.

2.3.1. Etude de spectroscopie d'absorption aux rayons X

Dans un premier temps nous avons effectué, en collaboration avec Lin Chen à Argonne National Laboratory (USA), des études de spectrométrie d'absorption des rayons X (XAS pour X-ray-Absorption Spectroscopy). Tout d'abord la spectroscopie XANES (pour X-ray-Absorption Near Edge Spectroscopy) a été utilisée pour essayer de déterminer le degré d'oxydation du cobalt dans l'échantillon. En effet, nous pouvons avoir une estimation du degré d'oxydation du cobalt dans l'échantillon en étudiant l'énergie de seuil (Edge) d'ionisation de cet ion dans le complexe. Lorsque le degré d'oxydation du cobalt augmente cette transition est observée à une énergie légèrement supérieure. On voit ainsi figure 102 que l'énergie de seuil d'ionisation est plus faible dans les échantillons de Co(II), comme pour $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ dissous dans l'acétonitrile (courbe noire), que dans les échantillons de Co(III). L'équilibration électrochimique d'une solution de $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$ à un potentiel situé entre le potentiel d'oxydation du couple Co(III)/Co(II) et celui du couple Co(II)/Co(I) (courbe verte) et celle à un potentiel supérieur à celui du couple Co(III)/Co(II) (courbe bleue) servent de référence pour les espèces à l'état d'oxydation +II et +III respectivement.

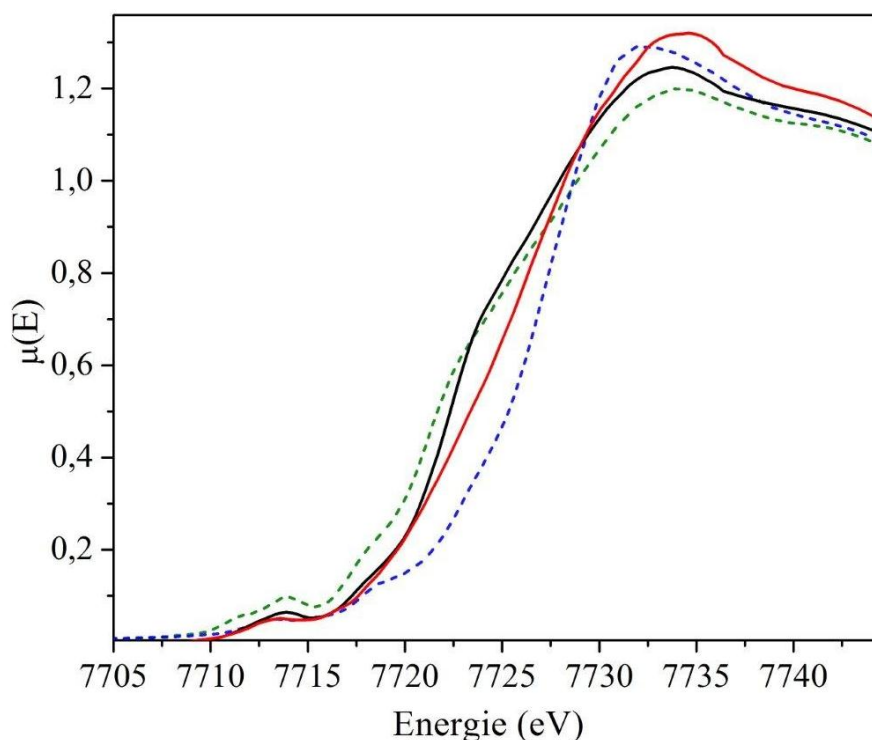


Figure 102. Spectres XANES de la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ dans l'acétonitrile (noir), dans la myoglobine (rouge) et le spectre de $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$ à l'état d'oxydation +II (vert) et +III (bleu).

Dans le cas de notre échantillon d'hybride Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] (courbe rouge de la figure 102), l'énergie de seuil se situe entre les énergies caractéristiques des degrés redox + II (courbe verte) et + III (courbe bleue). Cela pourrait indiquer que l'espèce hybride est un mélange d'espèces avec les deux degrés d'oxydation. Cependant l'énergie de seuil d'ionisation dépend également de la coordinence de l'ion métallique et augmente avec le nombre de ligands dans la sphère de coordination du métal. Or, comme nous allons le voir ci-dessous, l'étude EXAFS (Extended X-ray Absorption Fluorescence Spectroscopy) indique une augmentation du nombre d'atomes en premiers voisins ce qui pourrait également expliquer les différences observées.

En effet, l'étude du module de la transformée de Fourier du spectre d'absorption aux rayons X dans la région XAFS montre plusieurs pics qui apportent deux informations structurales. Succinctement, chaque pic peut être décrit comme une gaussienne dont l'intensité est proportionnelle au nombre de plus proches voisins. De plus, ce pic est centré sur la distance entre ces derniers et le métal. Cette distance est cependant de 0.2 Å à 0.5 Å plus faible que la distance réelle (décalage intrinsèque à la mesure dû aux calculs mathématiques à effectuer pour obtenir la transformée de Fourier).¹⁸³ On constate que le pic à 1.4 Å de la transformée de Fourier du signal obtenu dans le cas de l'hybride (en rouge figure 103) a une intensité plus élevée que celle obtenue pour le complexe [Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] (en noir figure 103).

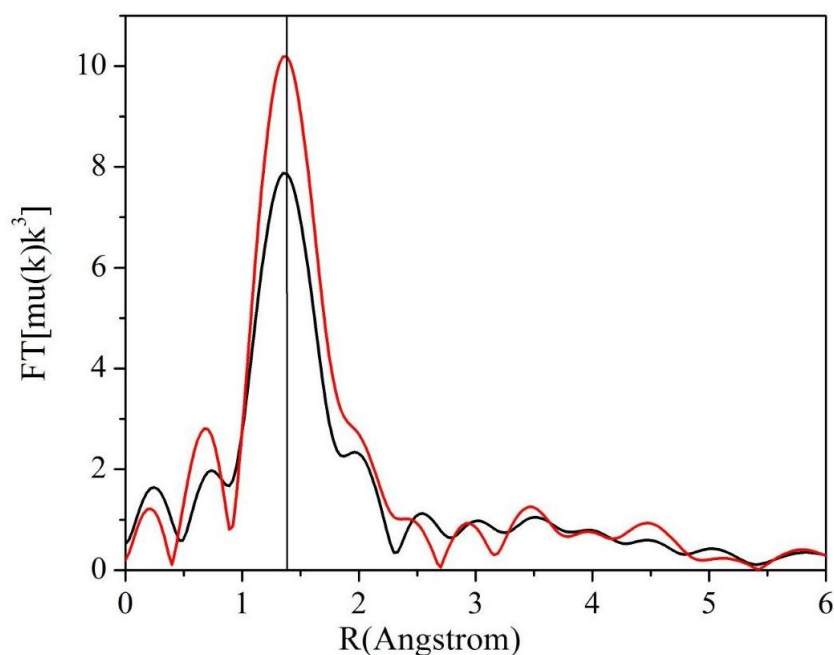


Figure 103. Transformée de Fourier du spectre XAFS de la cobaloxime [Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] seule (noir) et dans la myoglobine (rouge).

Il y a donc une augmentation du nombre de voisins proches du cobalt dans l'hybride par rapport au complexe seul ce qui peut s'expliquer par la présence supplémentaire d'un imidazole (provenant d'un résidu histidine de la protéine). De plus, le pic le plus intense obtenu avec l'hybride Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] (en rouge) est centré à une distance de 1.4 Å comme celui obtenu pour le complexe [Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] seul en solution. Nous pouvons donc en déduire qu'il n'y a pas d'élongation de la distance moyenne métal-azote en présence de myoglobine. Le pic de la transformée de Fourier du signal EXAFS vers 2 Å n'est pas modifié lorsque l'on passe de la cobaloxime seule à l'hybride. Ce signal est attribué à la coordination d'un ligand axial moins fortement lié, comme une molécule d'eau ou d'acétonitrile dans [Co(dmgbF₂)₂(CH₃CN)₂]. Il n'est pas possible cependant à partir de ces données d'obtenir des informations plus précises sur la coordination du cobalt avec une histidine dans la protéine. Nous verrons plus loin comment une modélisation par mécanique moléculaire (docking) permet d'expliquer les spectres EXAFS obtenus.

Ces études EXAFS semblent donc d'une part indiquer que l'ion cobalt est en coordination octaédrique au sein de l'hybride. Il y a cependant une incertitude sur le degré d'oxydation avec la possibilité d'un mélange de formes Co(II) et Co(III).

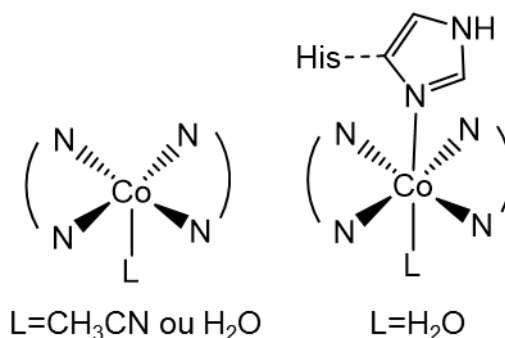


Figure 104. A gauche : Schéma de la cobaloxime pentacoordinée en solution dans l'acétonitrile ou l'eau. A droite : schéma de la cobaloxime hexacoordinée dans la protéine.

Ces incertitudes sur le degré d'oxydation du cobalt dans nos échantillons nous ont amené à essayer de confirmer ces résultats par spectroscopie photoélectronique aux rayons X (XPS), autre méthode spectroscopique utilisant les rayons X, permettant d'avoir accès au degré d'oxydation du cobalt, mais moins sensible à l'environnement de l'ion métallique. Ainsi, par exemple, un ligand chloré en axial du cobalt va perturber le signal observé en XANES mais pas celui en XPS.¹⁰⁷ L'étude est actuellement en cours.

2.3.2. Etude de spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)

2.3.2.1. Description des spectres et détermination de la sphère de coordination du cobalt

Pour confirmer l'existence d'une cobaloxime au degré d'oxydation + II, nous avons décidé de réaliser des études en résonance paramagnétique électronique (RPE). Le cobalt(II) est un métal d^7 bas spin et a donc un spin électronique $1/2$ ce qui fait qu'il est détectable par RPE à l'inverse du cobalt à l'état d'oxydation +III qui a un spin électronique nul. Le spin nucléaire du cobalt étant de $7/2$ on observe un couplage hyperfin entre le spin électronique et le spin nucléaire ce qui se caractérise sur le spectre RPE par l'observation de 8 raies. Comme la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ possède une symétrie rhombique le signal obtenu peut donc être caractérisé par 3 valeurs du tenseur g : g_x , g_y et g_z (figure 105).

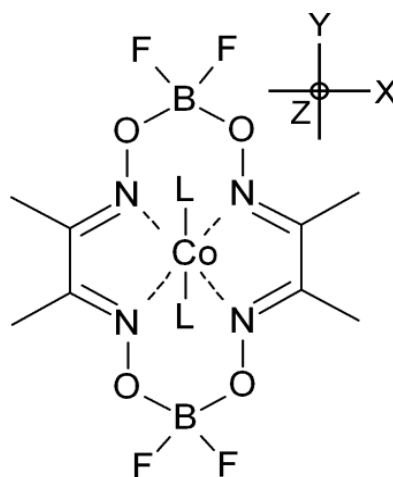


Figure 105. Structure de la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ selon le plan (O,X,Y,Z).

Plus particulièrement, le spectre RPE de la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ peut être divisé en deux zones de valeurs du facteur de bande g (grandeur caractéristique en RPE indépendante de la fréquence d'étude et qui caractérise la résonance de l'électron dans un environnement magnétique). D'un côté, les tenseurs g_x et g_y vont être influencés par l'environnement dans le plan de la cobaloxime et par l'environnement apporté par la présence de la protéine. Ils déterminent alors l'allure du spectre RPE pour la région de facteur g comprise entre 2.5 et 2.2. On peut ainsi voir des différences dans cette zone suivant la présence de la myoglobine (figure 109) ou de l'hème oxygénase 1 de rat (figure 110) autour de la cobaloxime.

Le tenseur g_z quand-à-lui détermine l'allure du spectre pour des valeurs de g entre 1.8 et 2.2. Il caractérise l'environnement axial de la cobaloxime. De plus, lorsque l'atome coordonné au cobalt a un spin nucléaire non nul (comme par exemple l'azote) on peut observer un couplage superhyperfine entre le spin nucléaire de l'atome coordonné ($I=1$ pour l'azote) et le spin

électronique du cobalt ($S=1/2$). Comme le montre une étude d'Oleg Poluektov et David Tiede,¹⁸⁴ le spectre RPE de la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ est très fortement modifié par la coordination d'un ou deux ligands pyridine via leur atome d'azote. Le couplage superhyperfín entre le spin nucléaire de l'azote de la pyridine et le spin électronique du cobalt est caractérisé par une modification des raies hyperfines du cobalt principalement au niveau de la composante g_z . Ainsi ces dernières apparaissent sous forme de singulets en absence de pyridine, de triplets lorsqu'une seule pyridine est coordonnée à la cobaloxime et enfin de multiplets lorsque deux ligands azotés sont coordonnés comme on peut le voir sur les spectres obtenus par Oleg Poluektov et représentés figure 106.

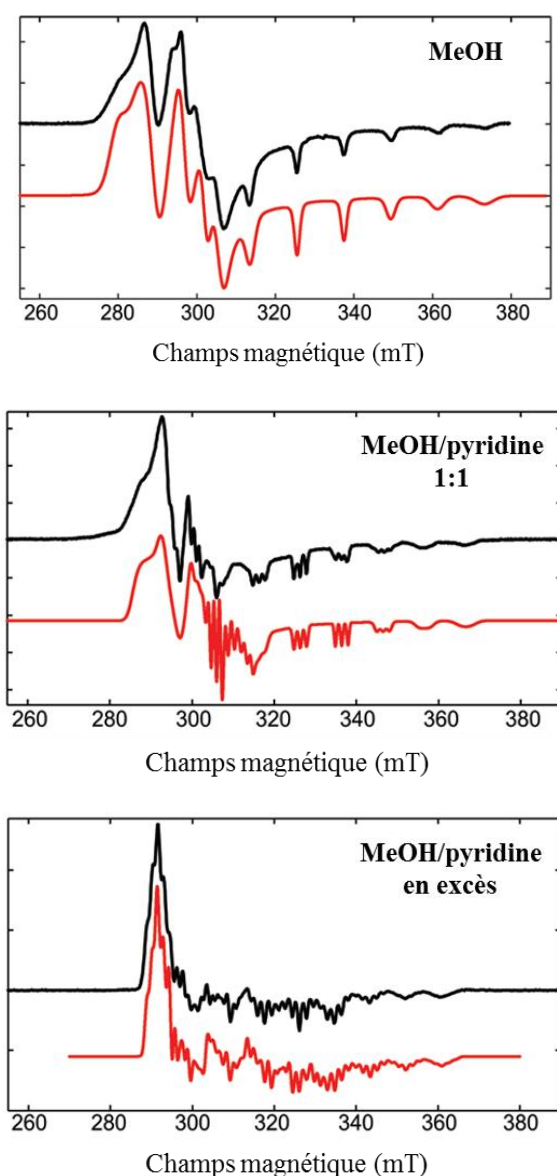


Figure 106. Spectres RPE en bande X (9.34 GHz) de la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ expérimental (noir) et simulé (rouge) dans différents solvants: méthanol (MeOH), méthanol avec 1 équivalent de pyridine et méthanol avec un excès de pyridine.

Nous avons dans un premier temps mesuré le spectre RPE de la cobaloxime dans du méthanol, présenté figure 107, afin de comparer les résultats obtenus à ceux présents dans la littérature.

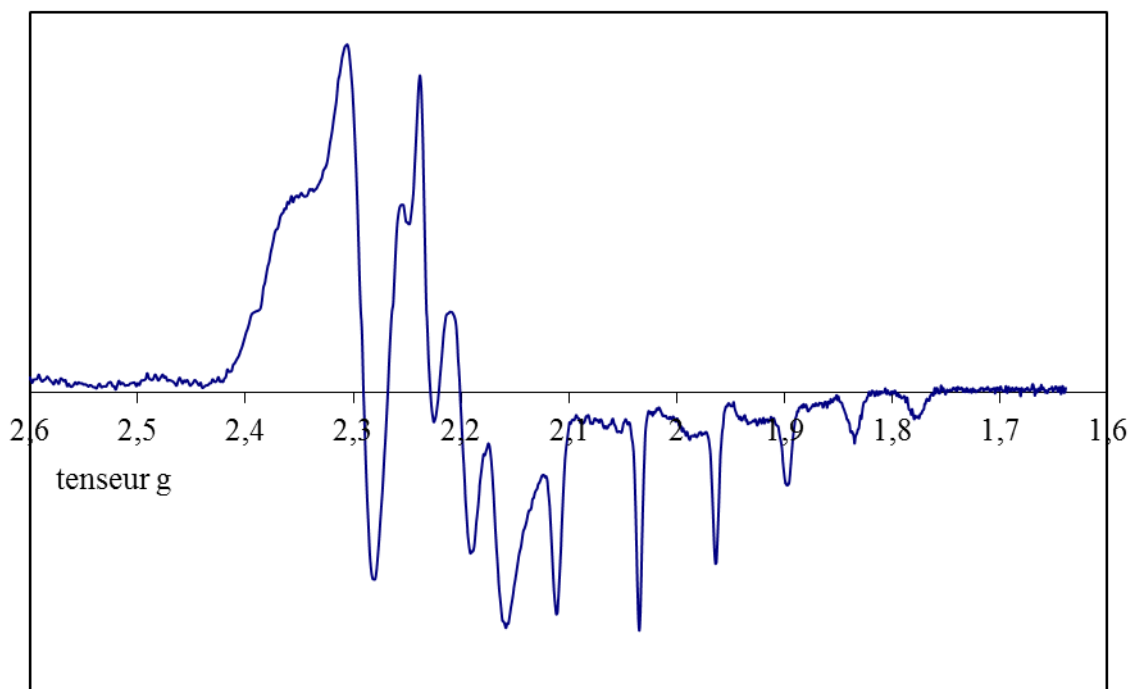


Figure 107. Signal RPE en bande X de $[\text{Co}(\text{dmgbF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ 2 mM, MeOH/Tol 1 :1, 10 K, 500 μW .

Un signal identique à ceux décrit dans la littérature (et notamment figure 106¹⁸⁴) est obtenu. Dans ces conditions les 8 raies ne sont pas toutes observées pour les composantes équatoriales du tenseur g . En effet, à cette fréquence l'anisotropie du tenseur g n'est pas bien résolue. On peut cependant avoir accès à la valeur du couplage hyperfin selon l'axe z (A_z) puisque les raies sont bien définies pour des valeurs de g comprises entre 2.15 et 1.7. Le couplage hyperfin correspond à l'écart en champ magnétique entre 2 raies. On obtient donc pour la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgbF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ dans un mélange méthanol/toluène 1:1 une valeur de couplage de 12 mT. La conversion entre la valeur de g et la valeur correspondante du champ magnétique (B) en Tesla est obtenue par un rapport dépendant de la valeur de la fréquence, de la constante de Planck ($h=6.626 \cdot 10^{-34}$ SI) et du magnéton de Bohr ($\mu_B=9.274 \cdot 10^{-24}$ SI) ($g=(F \times h)/(B \times \mu_B)$). En prenant la valeur de 2.008 pour g_z (obtenue par Oleg Poluektov et David Tiede lors de l'étude RPE de la cobaloxime dans du méthanol¹⁸⁴ et que l'on peut calculer sur notre spectre) on peut, à partir de la même formule, calculer la fréquence associée à cette valeur de couplage. On obtient alors une fréquence de couplage de 337 MHz qui est similaire à la valeur décrite dans la publication pour les mêmes conditions (338 MHz).

Nous avons ensuite commencé l'étude par RPE de l'hybride Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7 avec 10% de glycérol afin d'obtenir un verre bien défini permettant d'obtenir des spectres RPE bien résolus.

Le spectre RPE en bande X sur une grande fenêtre de champs magnétique (de 0 à 12000 mT),¹⁸⁵ et représenté figure 108 est typique d'une espèce de Co(II) bas spin.¹⁸⁶

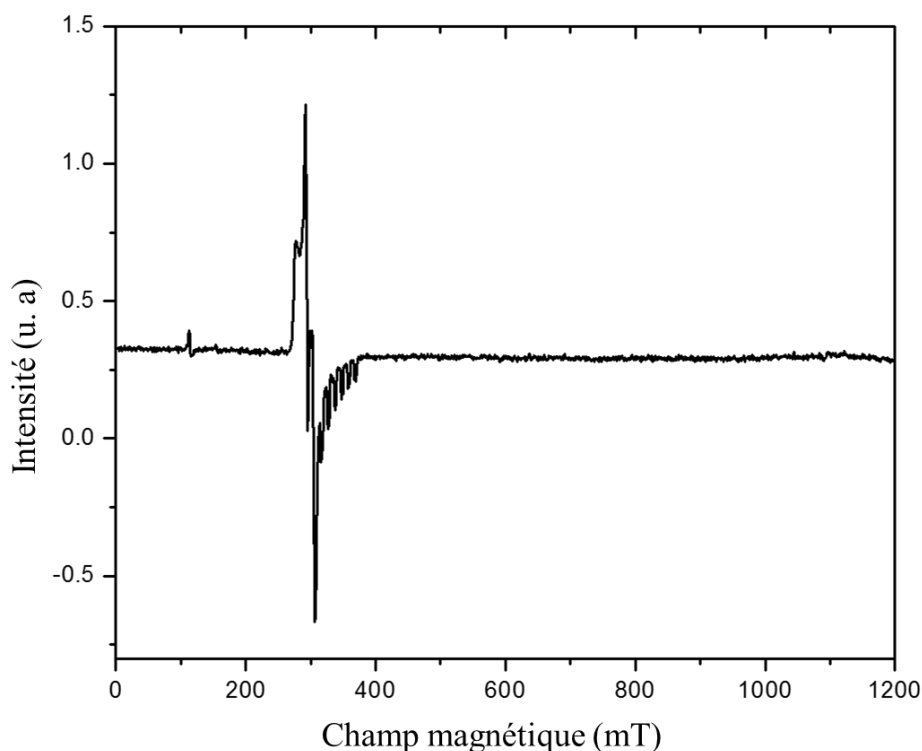


Figure 108. spectre RPE en bande X (9.34 GHz) de l'hybride Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂], 5 K, 1.8 mM en protéine, 716 μ M en cobalt, dans Tris/HCl 50 mM pH 7, glycérol 10 %.

Il n'y a donc pas d'espèce Co(II) haut spin ou d'espèce de type Co(III)-superoxo bien connue dans la chimie des complexes macrocycliques de cobalt et formée suite à la coordination d'une molécule d'oxygène sur un ion Co(II).^{184,187,188} Le faible signal observé autour de $g=6$ (correspondant à un champ magnétique d'environ 110 mT) provient certainement d'une trace résiduelle de fer (hème) dans l'échantillon.

Nous avons donc concentré notre étude sur le signal observé pour des valeurs de g entre 1.6 et 2.6 (correspondant à des champs magnétiques entre 250 mT et 410 mT) sur la figure 108.

Les figures 109 et 110 représentent les spectres RPE obtenus pour les hybrides Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] et HO1-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] respectivement.

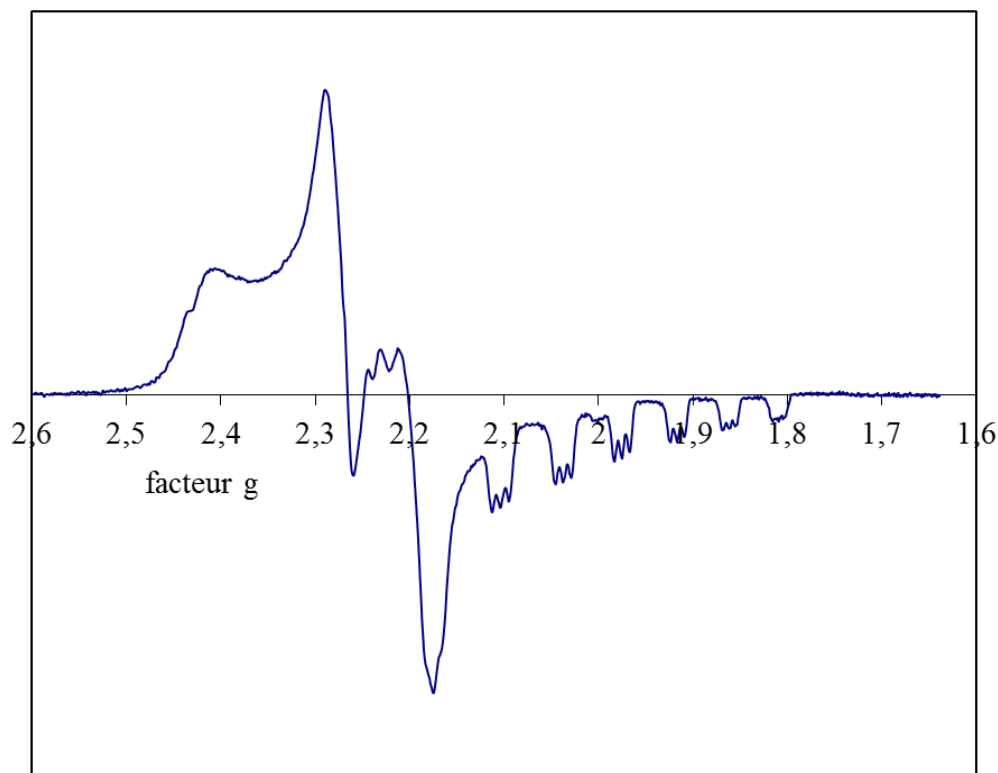


Figure 109. Signal RPE en bande X de Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂]. La concentration en cobalt dans l'échantillon a été mesurée par ICP/MS à 0.72 mM et la concentration totale en protéine est de 1.8 mM (dosage rose bengal). La concentration de l'hybride Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] est donc de 0.72 mM en présence de 1.08 mM d'apo-myoglobine dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7 NaCl 100 mM glycerol 10%, 10 K, 25 μ W.

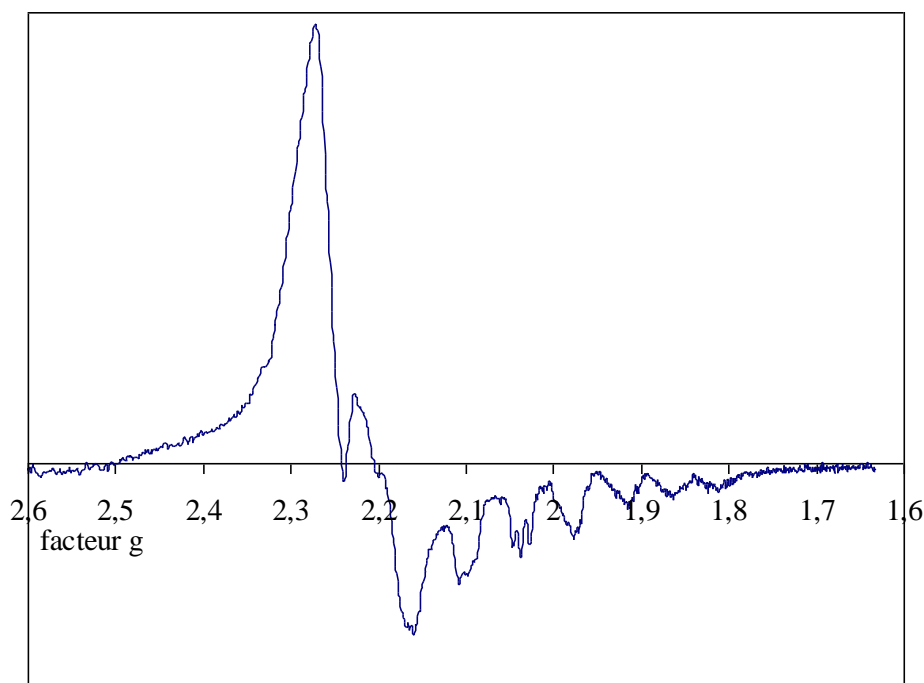


Figure 110. Signal RPE en bande X de HO1-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] 0.7 mM en protéine, 0.6 mM en cobalt. La solution a été obtenue par addition de 0.8 équivalent de complexe dans la solution d'apo-hème oxygénase dans tampon Tris/HCl 50 mM, 10 K, 20 μ W.

Pour ces deux spectres la structure hyperfine est bien résolue puisque l'on peut observer les 8 raies attendues pour le cobalt. On observe de plus des triplets à la place des singulets pour les raies de faible facteur g , correspondant à la composante g_z caractérisant un couplage superhyperfín avec un unique ligand azoté selon l'axe z (et donc en coordination axiale au niveau de la cobaloxime). On pourra noter que dans le cas des hybrides avec la myoglobine ce résultat est en accord avec l'étude EXAFS présentée plus haut.

2.3.2.2. Etude de saturation du signal et quantification de spin

Nous sommes allés plus loin dans cette étude spectroscopique via une collaboration avec Oleg Poluektov du groupe de David Tiede à Argonne National Laboratory. Grâce à une étude de l'évolution du spectre RPE en fonction de la puissance de l'onde incidente (figure 111) et la simulation des différents spectres, le cobalt paramagnétique présent dans l'hybride Mb-[Co(dmgBF₂)₂(H₂O)₂] a été quantifié.

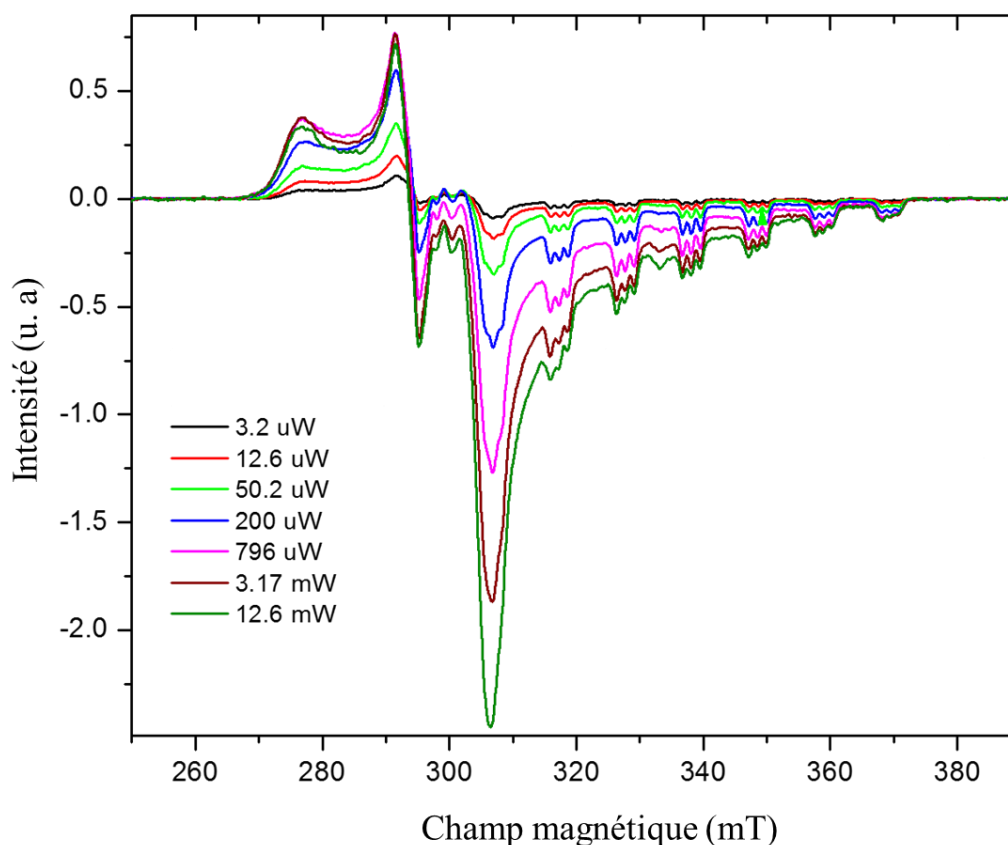


Figure 111. Spectres RPE en bande X (9.34 GHz) de l'hybride Mb-[Co(dmgBF₂)₂(H₂O)₂]. La concentration en cobalt dans l'échantillon a été mesurée par ICP/MS à 0.72 mM et la concentration totale en protéine est de 1.8 mM (dosage rose bengal). La concentration de l'hybride Mb-[Co(dmgBF₂)₂(H₂O)₂] est donc de 0.72 mM en présence de 1.08 mM d'apo-myoglobine dans du Tris/HCl 50 mM pH 7, glycérol 10%, 5 K, puissances croissantes entre 3.2 μ W (noir) et 12.6 mW (vert).

Il est en effet possible d'avoir accès à la quantité de spin de l'échantillon par intégration du signal RPE. On peut alors comparer la valeur obtenue avec des échantillons calibrés de radicaux nitroxides (présentant des caractéristiques de spectre RPE similaires) et avoir alors accès à la concentration en espèce paramagnétique dans l'échantillon.

Il faut pour cela faire les mesures dans des conditions pour lesquelles l'intensité du signal varie linéairement en fonction de la puissance utilisée. Cette linéarité est vérifiée jusqu'à une valeur de puissance limite, dépendant de l'échantillon, au-dessus de laquelle la linéarité n'est plus vérifiée à cause d'un phénomène physique de saturation du signal. Dans le cas de l'analyse RPE de l'hybride Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] le phénomène de saturation commence à être observé dès 10 μ W.

Ainsi, avec un échantillon de concentration protéique 1.8 mM et de concentration en cobalt de 716 μ M (perte de cobalt due à la concentration par centrifugation sur membrane) on peut déduire une concentration en espèce paramagnétique de 260 μ M (avec une erreur autour de 10%). Il en résulte donc que seul 36% du cobalt présent dans l'hybride est une cobaloxime de Co(II) bas spin. Il est important de noter que la méthode de quantification du cobalt paramagnétique a été validée par la quantification d'un échantillon de cobalt(II) [Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] dans du méthanol validant alors que 100% du cobalt présent dans l'échantillon est à l'état d'oxydation + II. Dans l'hybride il y a donc 64% de cobalt silencieux en RPE ce qui peut correspondre à la cobaloxime [Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] à l'état d'oxydation + III. Cette analyse est en accord avec les conclusions tirées des mesures de spectres XANES comme quoi notre échantillon serait un mélange d'espèces aux deux degrés d'oxydation. On peut cependant noter qu'il existe d'autres espèces dérivées des cobaloximes, qui peuvent être silencieuses en RPE comme par exemple lorsqu'il y a un couplage antiferromagnétique des deux atomes de cobalt au sein d'un dimère de cobaloxime au degré d'oxydation + II renfermant une liaison métal-métal.¹⁸⁷ Il peut y avoir également réaction de deux cobaloximes au degré d'oxydation + II avec une molécule de dioxygène et formation d'un pont peroxy entre les atomes de cobalt des deux cobaloximes, Ces hypothèses semblent cependant peu probables compte tenu de l'espace restreint au cœur de la protéine comme le montre les études de docking présentées plus loin. La formation d'agrégats de Co(0) est une dernière possibilité mais elle semble être exclue par les mesures XANES qui ne montrent pas la présence de cobalt à ce degré d'oxydation.

2.3.2.3. Détermination des constantes du signal (g_x , g_y et g_z) et des couplages hyperfin et superhyperfin

La différence d'environnement de la cobaloxime au sein de la myoglobine ou de l'hème oxygénase entraîne une différence des spectres RPE pour des valeurs de g autour de 2.5-2.3 correspondant à la zone des tenseurs g_x et g_y . A partir de simulations des spectres RPE obtenus pour l'hybride Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] (figure 112) et l'hybride HO1-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] (figure 113), Oleg Poluektov a pu extraire les paramètres de résonance magnétique (g_x , g_y et g_z) et les constantes de couplage hyperfin entre le cobalt et l'azote du ligand axial (A_x , A_y et A_z).

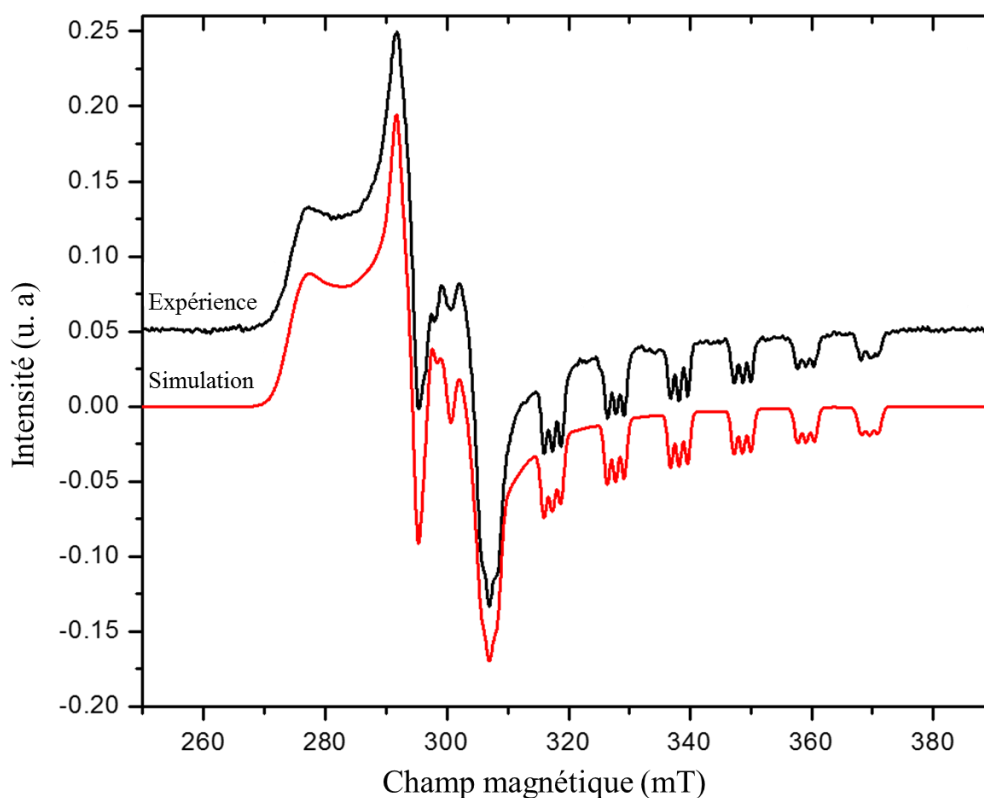


Figure 112. Spectre RPE en bande X (9.34 GHz) expérimental (noir) et simulé (rouge) de l'hybride Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] (1.8 mM en protéine, 716 μ M en cobalt dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7, glycérol 10%), 5 K.

Le spectre obtenu pour l'hybride Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] peut être simulé avec un seul jeu de paramètres (tableau 6) et correspond donc à la présence d'une seule espèce paramagnétique de Co(II).

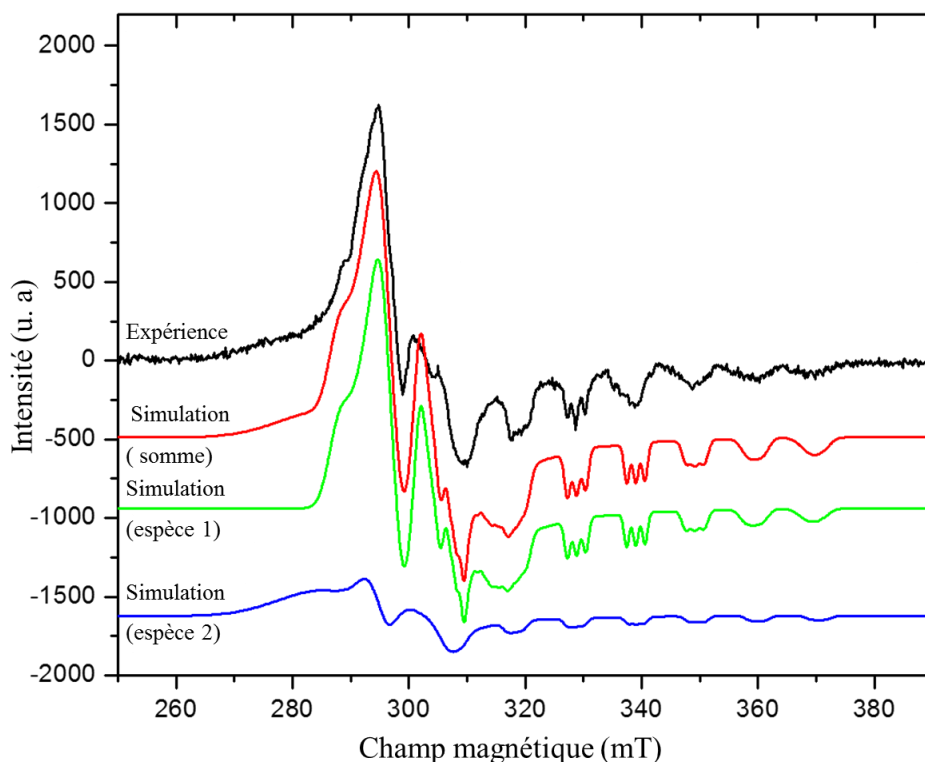


Figure 113. Spectre RPE en bande X (9.34 GHz) expérimental (noir) et simulé (espèce 1 en vert, espèce 2 en bleu et la somme correspondante en rouge) de l'hybride HO1-[Co(dm gBF_2) $_2$ (H $_2$ O) $_2$] (0.7 mM en protéine dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7), 5 K.

Le spectre RPE obtenu pour l'hybride HO1-[Co(dm gBF_2) $_2$ (H $_2$ O) $_2$] ne peut quant à lui être simulé que si deux jeux de paramètres sont introduits, les premiers correspondant à la présence d'une espèce globalement majoritaire (HO1 /1) et les seconds à la présence d'une deuxième espèce avec des paramètres spectroscopiques différents (HO1 /2). Les deux espèces présentes sont coordonnées à un ligand azoté que l'on peut postuler être l'unique histidine disponible dans la poche de l'hème oxygénase. On peut penser que les deux espèces présentes correspondent à un positionnement différent du complexe dans la poche protéique entraînant un environnement différent pour la cobaloxime.

2.3.2.4. Conclusion sur l'environnement de la cobaloxime dans les deux hybrides

Comme on l'a expliqué précédemment, les coordonnées g_x , g_y et g_z du tenseur g ainsi que la valeur de la constante de couplage ($A(^{59}\text{Co})$) superfine de l'électron célibataire avec le spin nucléaire du cobalt selon les trois directions de l'espace sont directement reliées à l'environnement de la cobaloxime. Les valeurs de ces constantes ainsi que celles de la constante de couplage superhyperfine ($A(^{15}\text{N})$) suivant les trois directions de l'espace pour les hybrides Mb-[Co(dm gBF_2) $_2$ (H $_2$ O) $_2$], HO1-[Co(dm gBF_2) $_2$ (H $_2$ O) $_2$] ainsi que pour la cobaloxime

dans d'autre environnements sont données dans le tableau 6. Une représentation graphique de ces paramètres est faite figures 114 et 115.

Environnement de la cobaloxime	g_x	g_y	g_z	$ A_x , A_y , A_z $ (^{59}Co) (MHz)	$ A_x , A_y , A_z $ (^{15}N) (MHz)
MbSw	2.3365	2.1835	2.0010	80, 10, 292 *	30, 30, 39 *
HO1	HO1/1	2.2550	2.1500	2.0010 #	5, 30, 285 *
	HO1/2	2.3400	2.1840	2.0010 #	73, 10, 292 *
Toluène PDI/Co 1:1	2.3473	2.1815	2.0000	85, 10, 306 *	30, 30, 40 *
Glycérol/H ₂ O	2.2750	2.1785	2.0065	15, 15, 329 *	n/ a
Méthanol pyridine en excès	2.2380	2.1530	2.0058	10, 10, 285 *	33, 36, 43

Tableau 6. Paramètres RPE issus de simulations pour $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ dans différents environnements. * Dans ces cas, les constantes de couplage hyperfin ou superhyperfyn A_x et A_y ont été estimée à partir de la largeur de bande. # La valeur la plus faible de g (g_z) a été fixée à 2.0010, proche de la valeur de g pour un électron libre.

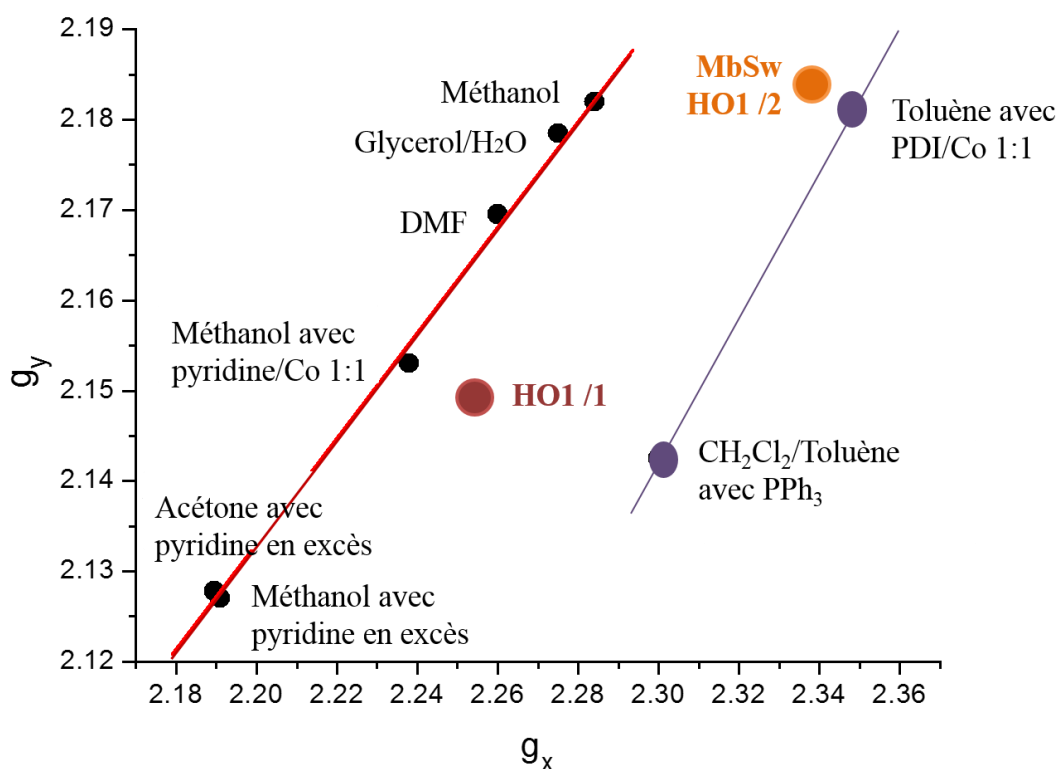


Figure 114. Représentation graphique de la valeur de g_y en fonction de celle de g_x pour la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ dans différents environnements.

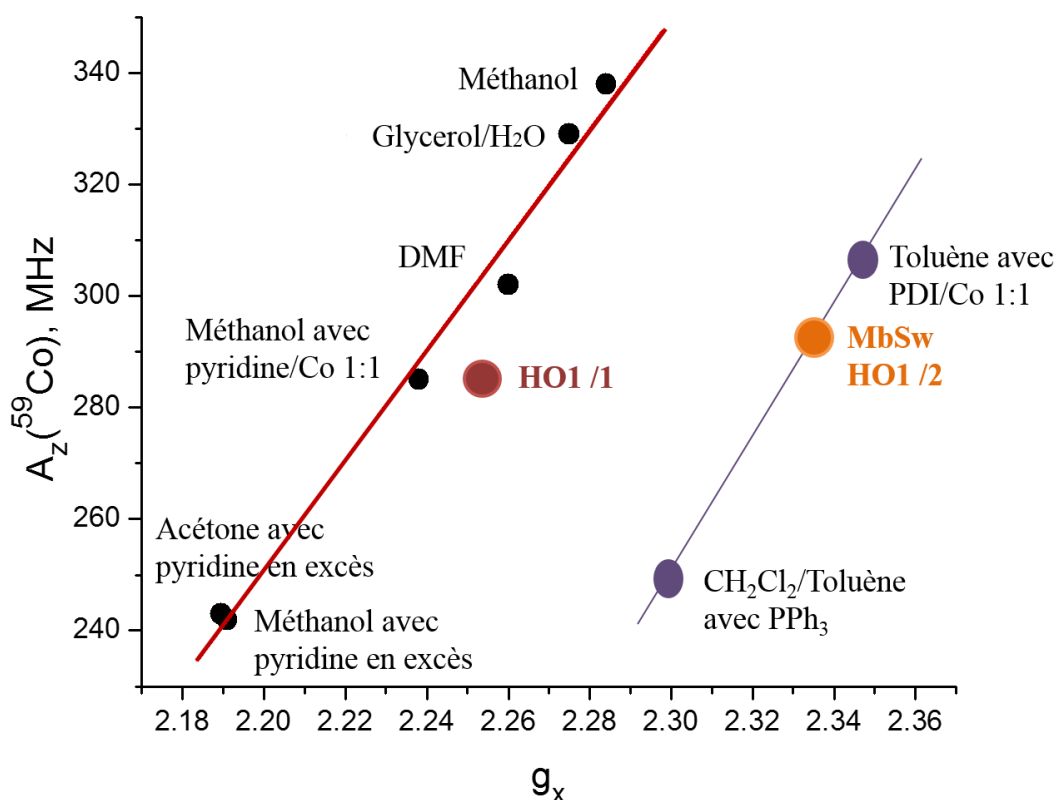


Figure 115. Représentation graphique de la valeur de A_z (Co) en fonction de celle de g_x pour la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ dans différents environnements.

Au travers de ces études graphiques on peut constater que la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ dans la myoglobine ainsi que dans l'espèce minoritaire HO1 /2 possèdent un environnement plutôt similaire à la cobaloxime dans du toluène en présence d'un équivalent d'un dérivé perylène diimide (PDI) portant un résidu pyridine dont la structure est représentée figure 116. Cette molécule, qui se lie au cobalt via la fonction pyridine, a été en effet étudiée par le groupe de David Tiede dans le cadre de la construction d'un système photocatalytique de production d'hydrogène, le motif PDI étant un chromophore organique bien connu. Il s'agit donc d'un environnement plutôt hydrophobe (toluène) et ne comportant qu'un seul ligand azoté axial. L'espèce majoritaire observée lorsque la cobaloxime est coordonnée à l'hème oxygénase (HO1 /1) possède quant à elle un environnement plutôt similaire à la cobaloxime dans du méthanol en présence d'un équivalent de pyridine. Il s'agit alors d'un environnement plutôt hydrophile avec également un unique ligand azoté axial.

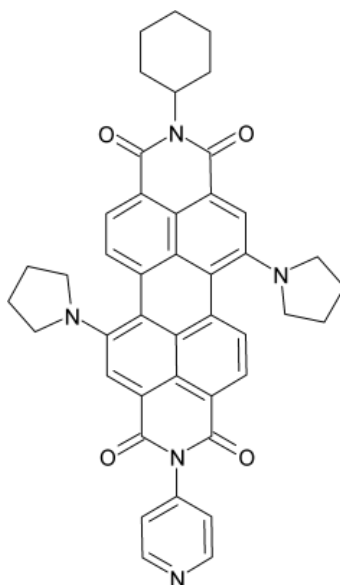


Figure 116. Structure du chromophore PDI utilisé (N-cyclohexyl-N'-4-pyridyl-1,7-dipyrolidinylperylene-3,4 :9,10-bis(di-carboximide)).

Cette analyse peut être corroborée par une analyse de l'environnement de l'hème dans le site actif de la myoglobine de cachalot ainsi que dans celui de l'hème oxygénase 1 de rat. En effet, comme on peut le voir sur la figure 117, dans la poche de la myoglobine, il y a très peu d'acides aminés hydrophiles puisque la grande majorité des éléments sont des chaînes carbonées et la zone en contact avec l'environnement extérieur est plutôt restreinte.

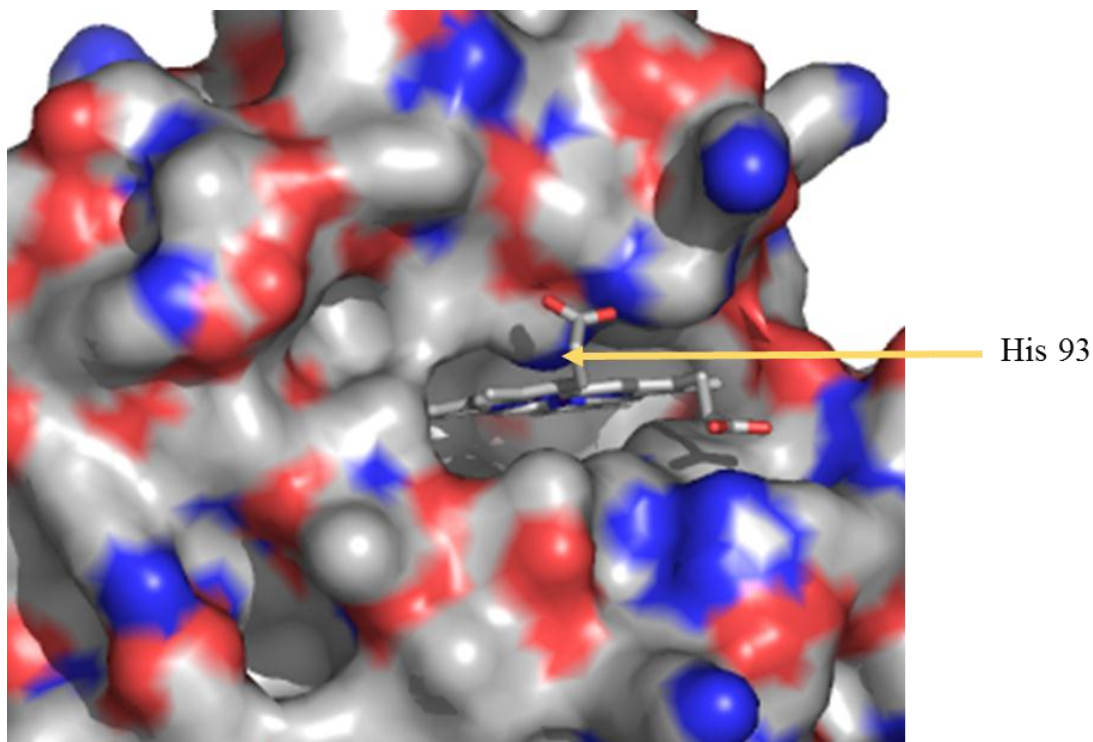


Figure 117. Représentation du site actif de la myoglobine de cachalot avec l'hème coordonné. Les zones apolaires sont grises (composées de carbone) et les zones hydrophiles sont rouges (atomes d'oxygène) et bleues (atomes d'azote).

Dans l'hème oxygénase, en revanche, l'hème a dans son environnement proche plus d'acides aminés hydrophiles comme on peut le voir figure 118. Il est également un peu plus exposé au milieu extérieur, la poche étant plus ouverte.

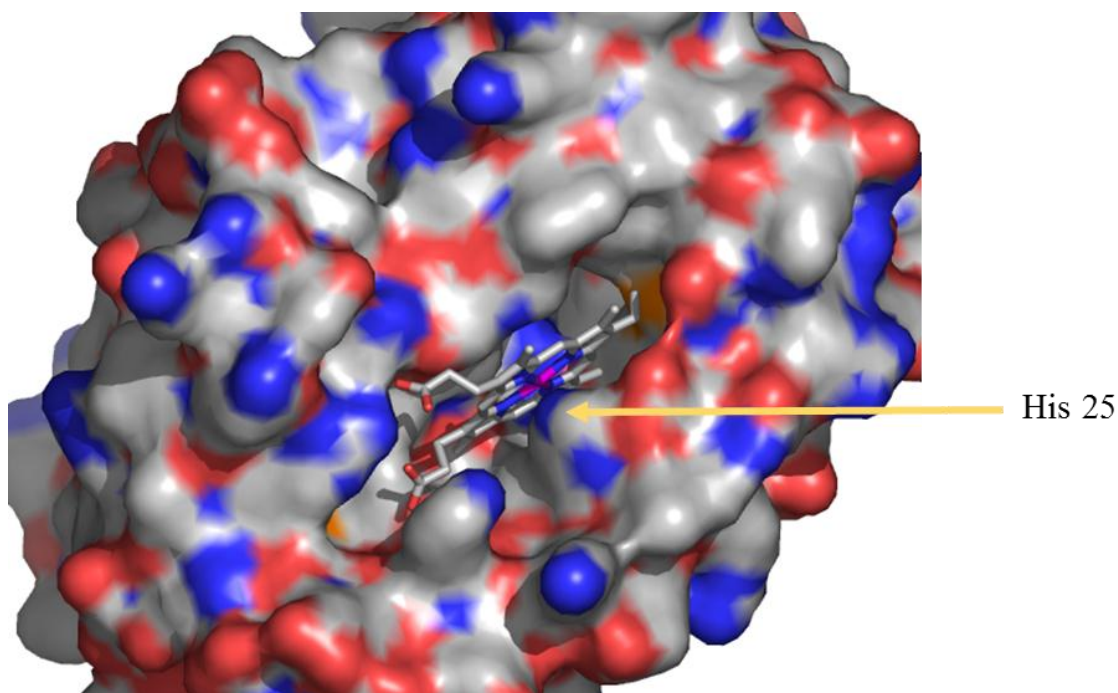


Figure 118. Représentation du site actif de l'hème oxygénase avec l'hème coordonné. Les zones apolaires sont grises (composées de carbone) et orange (souffre) et les zones polaires sont rouges (atomes d'oxygène) et bleues (atomes d'azote).

2.4. Conclusion

Au travers de ces différentes études nous avons pu prouver que, pour l'hybride avec la myoglobine, la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ est coordonnée dans la protéine par un unique ligand azoté (probablement l'histidine 93, la confirmation de la nature de ce ligand a été faite par étude de docking en collaboration avec Martin Field de l'IBS comme nous le verrons par la suite) et que la coordination de l'hème à l'histidine 93 n'est alors plus possible. La formation de l'hybride est aussi un processus irréversible qui ne modifie pas la structure globulaire générale de la protéine. La fraction de la cobaloxime à l'état d'oxydation II est dans un environnement très hydrophobe. Une autre fraction du cobalt dans l'hybride est diamagnétique, certainement à l'état Co(III) .

Pour l'hybride avec l'hème oxygénase nous savons que deux espèces coexistent avec des environnements différents de la cobaloxime. Cette dernière est dans les deux cas coordonnée à l'histidine 25 via un atome d'azote. On peut observer une espèce majoritaire située dans un environnement plutôt hydrophile alors qu'une espèce minoritaire est dans un environnement

ressemblant à l'environnement qu'elle trouve dans la myoglobine. On a également pu constater que 50% de l'hybride est formé de manière irréversible alors que les 50% restant semble être en équilibre. L'existence de deux populations dans l'échantillon est également confirmée par les études RPE. Pour des raisons de temps nous n'avons pas étudié de manière plus précise les facteurs orientant vers la formation de l'une ou de l'autre forme mais il est possible que le ratio entre les deux formes soit dépendant de la concentration de la solution et de la méthode de préparation des échantillons.

3. Caractérisation des hybrides Mb/HO1-[Co(dmgh)₂(H₂O)₂]

Comme nous l'avons vu au chapitre II, la cobaloxime [Co(dmgh)₂(H₂O)₂] présente de grandes similarités structurales (ainsi qu'une bande d'absorption similaire vers 450 nm) avec [Co(dmghBF₂)₂(H₂O)₂] mais elle est plus sensible à l'oxydation et moins stable en solution aqueuse car plus sensible à l'hydrolyse. De ce fait, les hybrides formés avec la myoglobine ou l'hème oxygénase présentent de nombreuses différences par rapport à ceux formés avec la cobaloxime [Co(dmghBF₂)₂(H₂O)₂].

3.1. Spectroscopie UV/Visible et quantification du cobalt

Nous avons appliqué le même protocole ainsi que la même technique d'étude que précédemment. Toutes les analyses sont réalisées en conditions anaérobies afin d'éviter l'oxydation de la cobaloxime en cobalt(III). Cependant, la fraction protéique après élimination de l'excès de complexe possède des caractéristiques UV-Visible plutôt en accord avec la présence de la cobaloxime à l'état d'oxydation III dans la protéine. En effet, on observe bien sur le spectre UV-visible de l'hybride représenté figure 119 une bande d'absorbance à 280 nm caractérisant la présence de protéine mais il n'y a pas d'absorbance autour de 450 nm. On observe à la place une forte augmentation autour de 250 - 260 nm plus en accord avec le spectre UV-Visible de la cobaloxime à l'état d'oxydation III et correspondant à des bandes de transfert de charge.

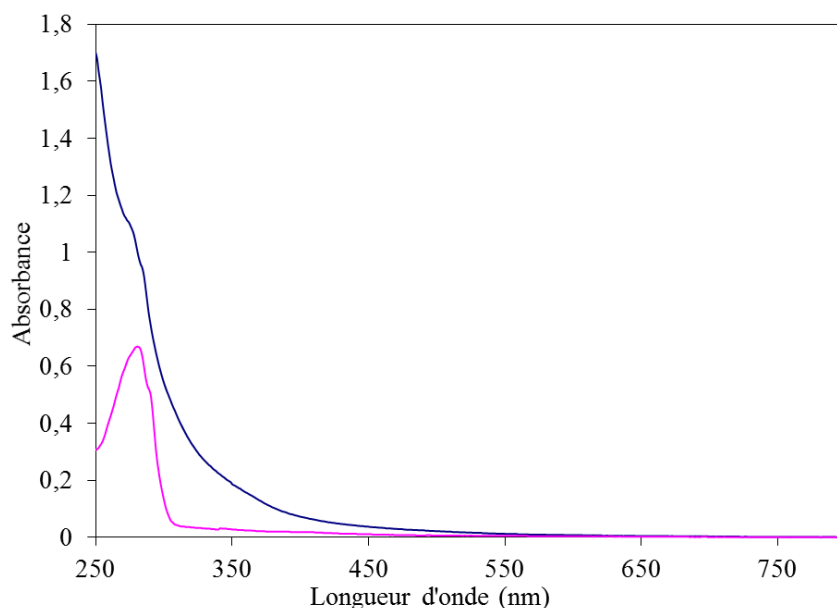


Figure 119. Spectres UV-visible de l'apo-myoglobine (rose) et de la fraction protéique obtenue après élimination de l'excès de complexe $[\text{Co}(\text{dmgh})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (bleu) ($40 \mu\text{M}$ dans du tampon Tris 50 mM pH 7).

On observe la même signature spectrale lorsque $[\text{Co}(\text{dmgh})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ est inséré dans l'hème oxygénase comme le montre le spectre UV-visible représenté figure 120.

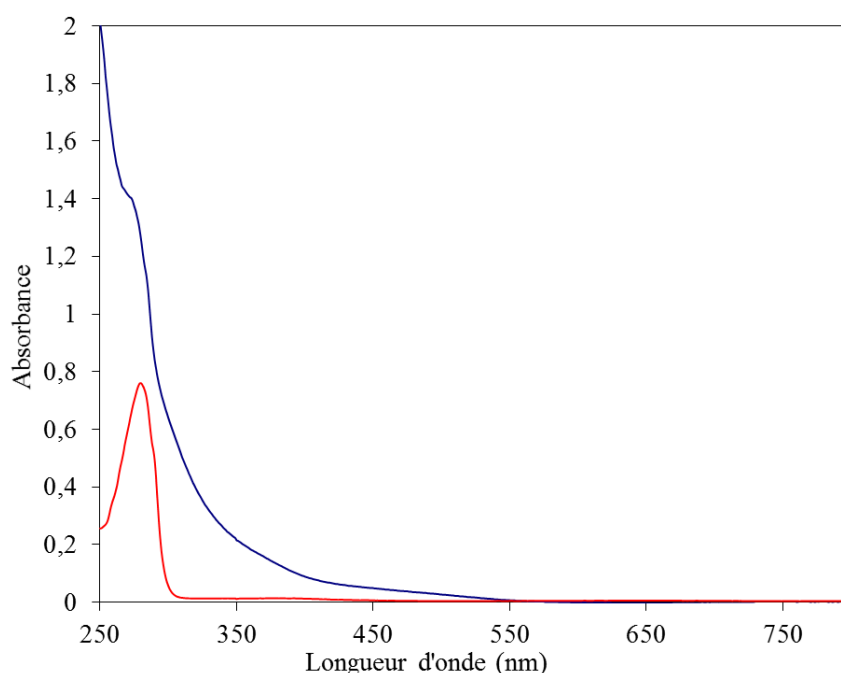


Figure 120. Spectres UV-visible de l'apo-hème oxygénase (rouge) et de la fraction protéique obtenue après élimination de l'excès de complexe $[\text{Co}(\text{dmgh})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (bleu) ($23 \mu\text{M}$ dans du tampon Tris 50 mM pH 7).

La présence de protéine a été confirmée par dosage protéique (rose bengal) et la présence de cobalt dans un rapport 1:1 avec la protéine par ICP-MS. Le même comportement que l'hybride Mb- $[\text{Co}(\text{dmgh})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ face à la concentration a été observé. Ainsi, les échantillons étant

étudiés directement après colonne d'exclusion stérique renferment une quantité stœchiométrique de cobalt par rapport à la protéine (écart de moins de 6% donc négligeable compte tenu des erreurs sur les mesures de concentration de protéines). Après concentration, les échantillons possèdent une quantité sous-stœchiométrique de cobalt pouvant aller jusqu'à 60% de perte par rapport à la concentration protéique pour des concentrations protéiques de l'ordre de 2 mM. Le même protocole de préparation que pour les hybrides à partir de $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ a donc été utilisé en évitant au maximum les étapes de concentration lorsque cela était possible (c'est-à-dire pour toutes les études sauf celles de cristallogénèse pour laquelle une concentration de l'ordre du millimolaire a été nécessaire). Typiquement, la préparation des hybrides se fait à partir de solutions d'apo-myoglobine de concentration de l'ordre de la centaine de micromolaire pour une concentration en hybride après purification de l'ordre de 50 μM . Les études menées afin de préparer les hybrides à partir de solutions plus concentrées en protéine ont abouti à une précipitation de la protéine lors de l'ajout de la solution de complexe.

3.2. Etude du degré d'oxydation du cobalt dans l'hybride

Afin de mieux comprendre les caractéristiques spectroscopiques, et de clarifier l'état d'oxydation du complexe à l'intérieur de la protéine, nous avons étudié l'hybride par spectroscopie d'absorption aux rayons X.

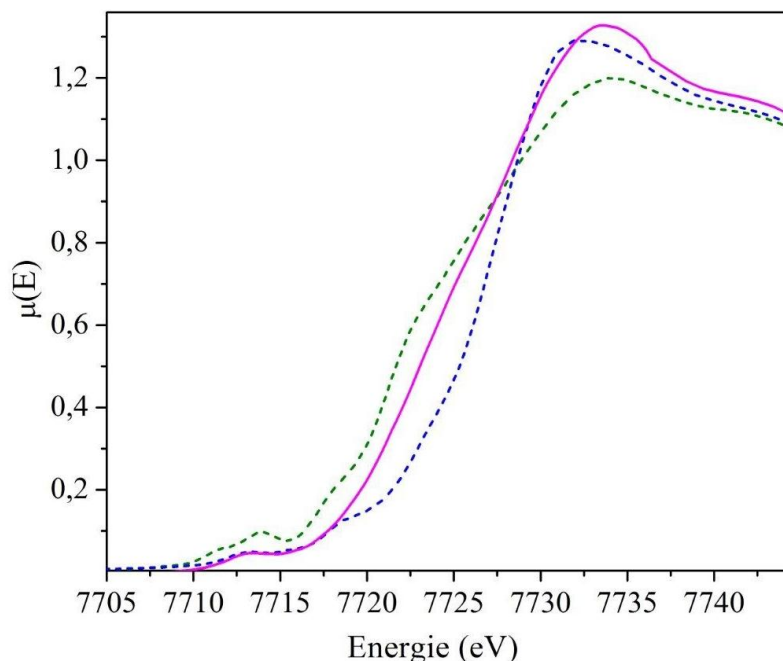


Figure 121. Spectres XANES de la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ dans la myoglobine (rose) et le spectre de la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{CH}_3\text{CN})_2]$ à l'état d'oxydation + II (vert) et + III (bleu) (voir figure 102).

Avec cette technique nous observons très peu de différences entre le spectre de Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] et Mb-[Co(dmghH)₂(H₂O)₂] comme on peut le voir figure 121 ce qui tend à dire, d'après la même analyse que celle faite pour Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂], soit qu'il y a dans l'hybride un mélange de cobalt aux états d'oxydation II et III soit que la coordinence du cobalt augmente lors de l'insertion dans la protéine.

Cependant il n'a pas été possible d'observer de signal en résonance paramagnétique électronique pour l'hybride ce qui tend à dire que l'hybride est composé uniquement d'espèce(s) diamagnétique(s). Ces analyses ainsi que l'allure globale du spectre UV-visible de l'hybride tendent, en l'absence d'autres hypothèses plausibles, vers la présence majoritaire de la cobaloxime à l'état d'oxydation +III dans la protéine. L'apparente incohérence entre les résultats obtenus en spectroscopie d'absorption aux rayons X et en RPE peut s'expliquer par la photoréduction du métal par irradiation aux rayons X lors des mesures EXAFS et XANES. La plus grande proportion d'espèce oxydée dans l'hybride Mb-[Co(dmghH)₂(H₂O)₂] par rapport à l'hybride Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] peut être expliquée par des études faites sur les deux cobaloximes en milieux organique et aqueux. Il a été montré que la cobaloxime [Co(dmghH)₂(H₂O)₂] ($E(\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}) = +0.15 \text{ V vs Ag/AgCl}$ dans du DMF à 100 mV/s)¹³ est plus sensible à l'oxydation que la cobaloxime [Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] ($E(\text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}}) = +0.6 \text{ V vs Ag/AgCl}$ dans du DMF à 100 mV/s).¹² De plus, la coordination d'une pyridine en axial du cobalt augmente la sensibilité des complexes macrocycliques de cobalt vis-à-vis de l'oxygène.^{187,189,190} Ce dernier point est important car une analyse UV-visible du complexe en excès n'ayant pas interagi avec la protéine a montré que le cobalt était encore à l'état d'oxydation +II dans ces fractions ce qui implique que, si la majorité du cobalt est oxydé dans la protéine, cela est dû à la réactivité particulière de la cobaloxime au sein de la protéine et donc peut-être à la coordination axiale d'un ligand azoté sur le cobalt; si l'on suppose bien sur que la cobaloxime [Co(dmghH)₂(H₂O)₂] interagit avec la myoglobine de la même manière que [Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂].

Dans ces conditions et comme nous l'avons confirmé expérimentalement, l'étude par résonance paramagnétique électronique ne peut pas nous apporter d'informations sur l'environnement du cobalt dans la protéine. Cependant nous avons pu avoir accès à des informations plus globales comme la forme de l'hybride en solution ainsi que sa structure tertiaire.

3.3. Etude de la forme en solution des hybrides Mb/HO1- [Co(dm gH) $_2$ (H $_2$ O) $_2$]

Comme pour l'hybride Mb-[Co(dm gBF_2) $_2$ (H $_2$ O) $_2$], nous avons d'abord confirmé que la présence du complexe [Co(dm gH) $_2$ (H $_2$ O) $_2$] dans la protéine ne modifie pas la structure générale globulaire de la protéine par élution au travers d'une colonne d'exclusion stérique préalablement étalonnée. L'hybride présente une zone d'absorbance à 280 nm due à la protéine (figure 120). Une analyse en dichroïsme circulaire dans cette région de longueur d'onde nous a permis d'avoir une idée des structures secondaires majoritaires dans l'hybride c'est-à-dire à la proportion d'hélices alpha par rapport aux feuillets bêta. Ainsi on peut constater que l'hybride Mb-[Co(dm gH) $_2$ (H $_2$ O) $_2$] présente, comme on peut le voir figure 122, une structure tertiaire majoritairement formée d'hélices alpha comme cela est le cas pour la protéine sous forme apo ou holo.

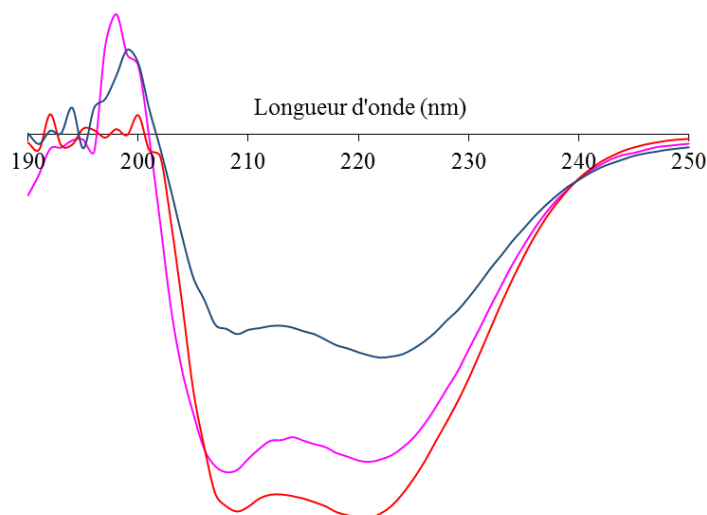


Figure 122. Spectre de dichroïsme circulaire de l'apo-myoglobine (rouge, 80 μ M dans du tampon Tris/HCl 50mM pH7), de l'holo-myoglobine (bleu, 20 μ M dans du tampon Tris/HCl 50mM pH7) et de Mb-[Co(dm gH) $_2$ (H $_2$ O) $_2$] (rose, 75 μ M dans du tampon Tris/HCl 50mM pH7).

En effet les hélices alpha, les feuillets beta ou une absence de structure secondaire (pelotes statistiques) de la protéine ont des caractéristiques en dichroïsme circulaire différentes comme on peut le voir avec les spectres représentés figure 123. Une étude détaillée, plus particulièrement autour de 190 nm-200 nm, montre qu'il y a une plus grande structuration de la protéine en présence d'hème ou de la cobaloxime [Co(dm gH) $_2$ (H $_2$ O) $_2$] qu'en absence de cofacteur. En effet dans le cas de l'apo-myoglobine (courbe rouge figure 122) on n'observe pas de signal en dichroïsme circulaire dans cette zone de longueur d'onde alors qu'en présence d'hème (courbe bleue figure 122) ou de cobaloxime (figure rose figure 122) on observe un signal légèrement positif. Cette différence peut indiquer un pourcentage de pelotes statistiques

plus faible dans la protéine en présence d'hème ou de cobaloxime et donc une plus grande structuration de la protéine. On peut donc supposer qu'en réponse à la présence de cobaloxime, l'hélice F se forme, comme cela est le cas lors de l'insertion de l'hème.

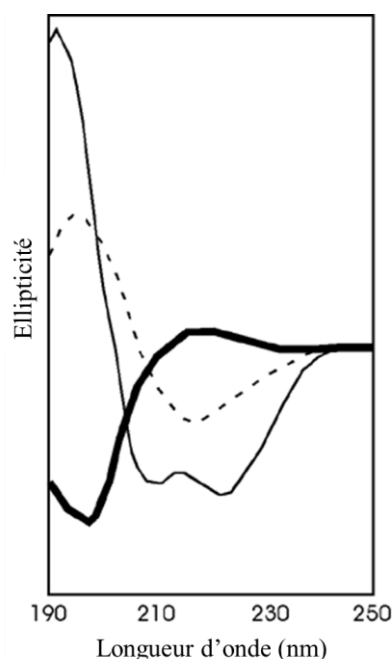


Figure 123. Spectres de dichroïsme circulaire caractéristiques des hélices alpha (trait plein), des feuillets bêta (trait pointillé) et des pelotes statistiques (trait gras).¹⁹¹

L'apo-hème-oxygénase a une structuration similaire aux formes apo et holo de la myoglobine avec une majorité d'hélices alpha comme cela a été décrit dans le chapitre II. Cette similarité entraîne une ressemblance dans leurs spectres de dichroïsme circulaire entre 180 nm et 260 nm caractéristiques des structures secondaires des protéines (figure 124).^{192,193}

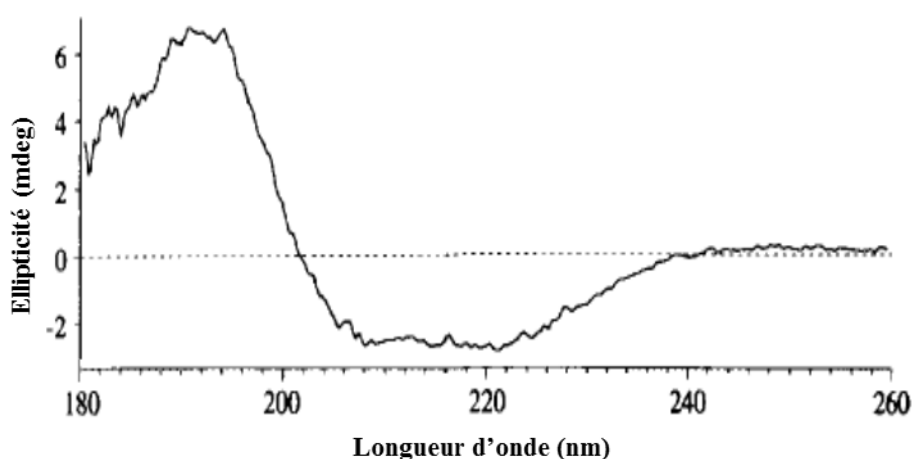


Figure 124. Spectre de dichroïsme circulaire de l'apo-hème oxygénase 1 de Rat à 1 mg/mL dans du tampon phosphate de potassium 0.1 M pH 7 à 20°C issu de la publication 24.

La présence de la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ ne perturbe pas les structures secondaires de l'hème oxygénase qui sont majoritairement des hélices alpha comme on peut le voir sur le spectre bleu de la figure 125. Nous pouvons de plus constater en comparant ce spectre avec celui obtenu pour l'hybride $\text{Mb}-[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ que les deux hybrides possèdent des signatures en dichroïsme circulaire similaires. Il y a donc globalement le même pourcentage d'hélices alpha dans ces deux hybrides par rapport aux autres structures secondaires. Il est plus difficile de conclure dans le cas de l'hème oxygénase quant à une plus grande structuration de la protéine induite par la présence de la cobaloxime.

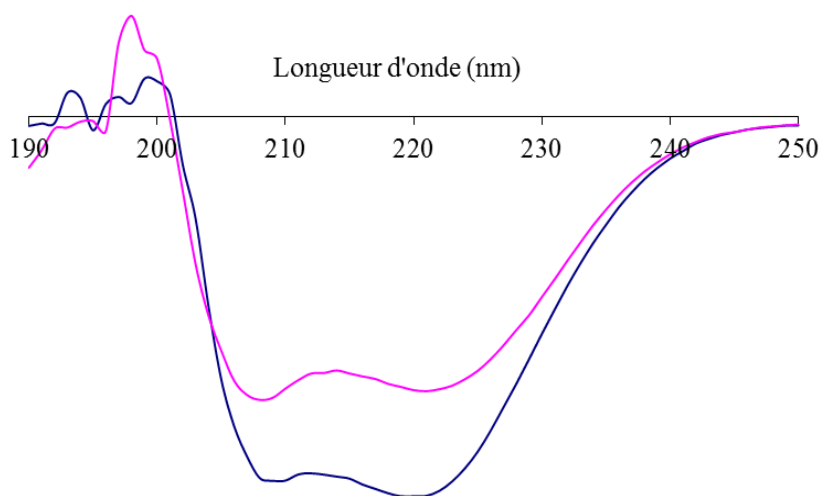


Figure 125. Spectre de dichroïsme circulaire de l'hybride $\text{HO1}-[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (bleu - $30\mu\text{M}$) et $\text{Mb}-[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (rose - $43\mu\text{M}$) tampon Tris/HCl 50 mM pH 8.

3.4. Stabilité des hybrides $\text{Mb}/\text{HO1}-[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$

3.4.1. $\text{Mb}-[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$

Un maximum d'informations ayant été réuni sur l'environnement de la cobaloxime ainsi que sur la structure globale de la protéine, nous nous sommes intéressés à sa stabilité en solution. Dans ce cadre l'hybride a montré des caractéristiques similaires à $\text{Mb}-[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$. Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à la fluorescence des tryptophanes présents dans la myoglobine. En effet, comme cela est expliqué plus haut pour l'hybride $\text{Mb}-[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, on observe une extinction de fluorescence de la protéine en présence d'une quantité croissante de complexe $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (figure 126). Comme cela est le cas pour $\text{Mb}-[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, on observe une saturation quasi-totale du signal pour un grand excès de complexe (10 équivalents) nous permettant de calculer une constante de dissociation d'environ $12\mu\text{M}$ ($\pm 2\mu\text{M}$). Suivant le même raisonnement que pour l'hybride

Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂], il est probable que cette constante soit reliée à l'équilibre entre l'hybride et la cobaloxime [Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] en excès.

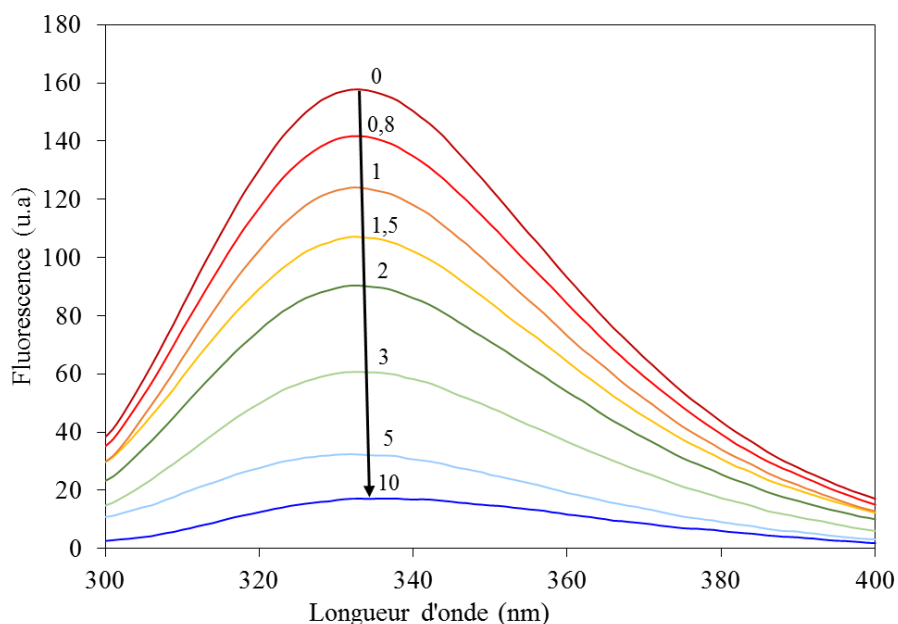


Figure 126. Fluorescence de la myoglobine en fonction d'un ajout croissant de cobaloxime [Co(dmgbH)₂(H₂O)₂] (de 0 à 10 équivalents) à une concentration de 4.6 μ M en protéine dans du tampons Tris/HCl 50 mM pH 7.

Nous avons donc décidé d'étudier l'insertion de l'hème dans l'hybride Mb-[Co(dmgbH)₂(H₂O)₂] par spectroscopie UV-visible. Comme cela est le cas pour l'hybride Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂], on n'observe pas, à une concentration de 10 μ M pendant 4 h, le décalage de la longueur d'onde du maximum de la bande de Soret de l'hème, caractéristique de la bonne insertion de l'hème dans la myoglobine (figure 127).

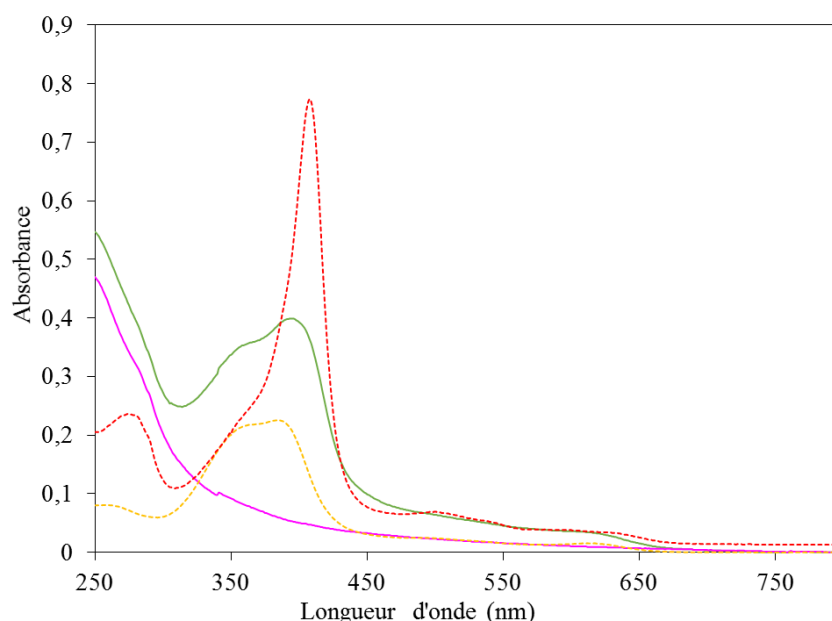


Figure 127. Spectres UV-visible de l'holo-myoglobine (rouge), de l'hème libre en solution (jaune), de l'hybride Mb-[Co(dmgbH)₂(H₂O)₂] (rose) et de l'hybride Mb-[Co(dmgbH)₂(H₂O)₂] en présence d'hème (vert) (à 10 μ M dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.5 – spectres stables pendant au moins 4 h).

Nous pouvons donc conclure que, malgré les différences spectroscopiques que l'on a pu observer, l'hybride obtenu entre la myoglobine et la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ possède les mêmes propriétés de stabilité que l'hybride Mb- $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$. Il s'agit d'une espèce stable, formée de manière irréversible par interaction de la protéine avec $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$.

3.4.2. HO1- $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$

Comme pour l'hybride HO1- $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, nous avons constaté qu'une partie de la protéine est encore capable de fixer son cofacteur biologique. Ainsi, de la même manière, l'étude de l'absorbance du maximum de la bande de Soret de l'hème en fonction du nombre d'équivalents d'hème dans la solution nous permet de conclure qu'environ 60% de l'hème oxygénase est encore capable de fixer son cofacteur biologique à la place de la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$. Les 40% restants sont fixés à la cobaloxime de manière irréversible.

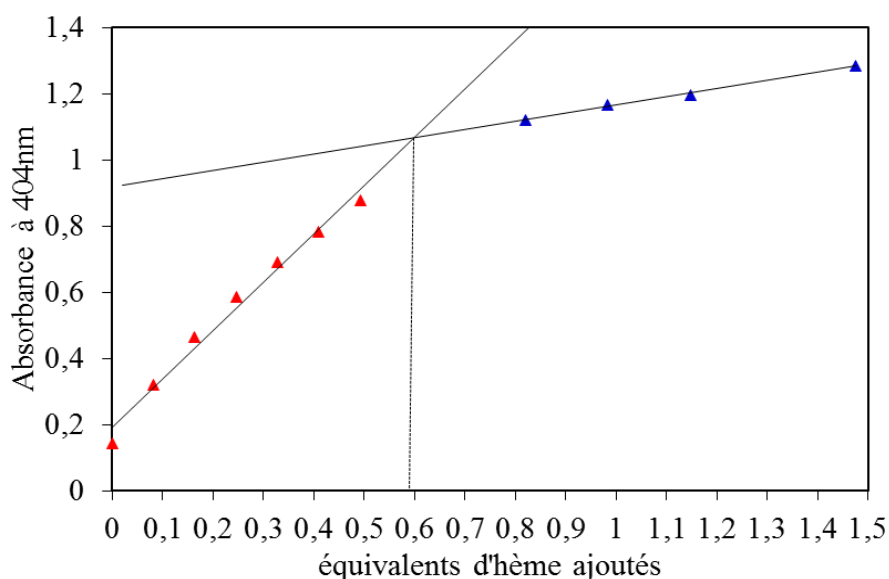


Figure 128. Absorbance à 404 nm d'une solution d'hybride HO1- $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ en fonction du nombre d'équivalents d'hème ajouté à la solution. Les conditions de mesure et de régression linéaire sont données dans la partie Matériels et Méthodes.

4. Etude de Mb-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂]

Nous nous sommes intéressés pour l'instant à la formation d'hybrides avec des complexes de cobalt(II). Comme indiqué en partie 1.1 la myoglobine et l'hème oxygénase interagissent aussi avec le complexe diimine dioxime de cobalt(III) [Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂].

4.1. Spectroscopie UV-Visible

Dans le cas de la formation d'hybrides Mb-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] ou HO1-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] nous n'avons pas travaillé en conditions anaérobies car le complexe n'est pas sensible à l'oxygène. Nous avons vérifié la formation des hybrides par spectrométrie UV-visible (figures 129 et 130 respectivement) comme cela a été présenté précédemment.

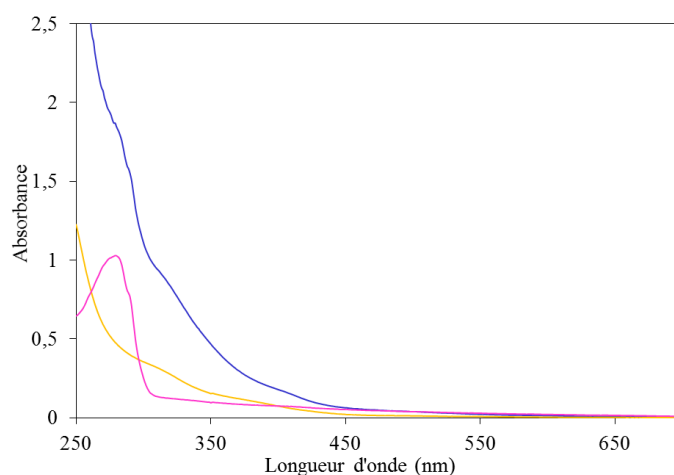


Figure 129. Spectres UV-Visible de l'apo-myoglobine (rose), de [Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] (jaune) et de l'hybride Mb-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] (bleu) à 80 μ M dans du tampon Tris/HCl 50 mM NaCl 100 mM pH 7.5.

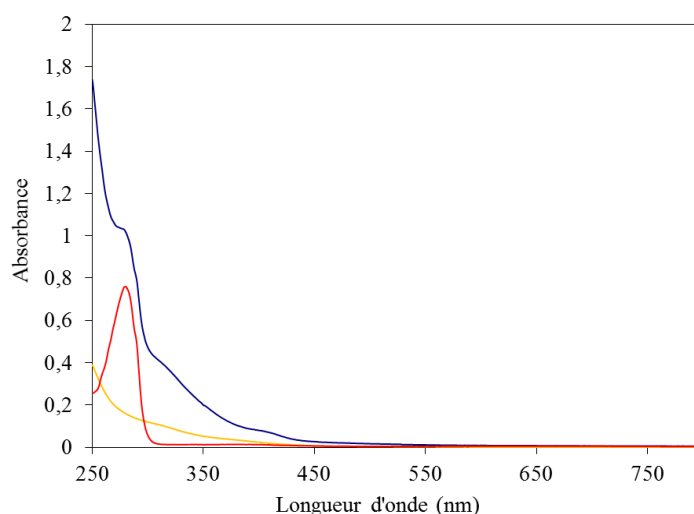


Figure 130. Spectres UV-Visible de l'apo-HO1 (rouge), de [Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] (jaune) et de l'hybride HO1-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] (bleu) à 23 μ M dans du tampon Tris/HCl 50 mM NaCl 100 mM pH 7.5.

Comme on peut le voir les spectres UV-Visible des hybrides Mb-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] et HO1-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] ont des allures similaires aux spectres des hybrides Mb-[Co(dmgh)₂(H₂O)₂] et HO1-[Co(dmgh)₂(H₂O)₂], ce qui, dans ce cas, est cohérent avec le fait que le cobalt est au degré d'oxydation +III. De plus on retrouve également pour ces deux hybrides une absorption entre 300 nm et 400 nm plus intense que pour le complexe seul en solution.

4.2. Etude de la stabilité et structures secondaires de l'hybride Mb-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂]

Nous avons étudié la stabilité de l'hybride comme précédemment par suivi spectroscopique de l'insertion d'hème dans la myoglobine. Comme nous pouvons le voir figure 131, on n'observe pas de décalage de la bande de Soret de l'hème en présence de l'hybride ce qui nous permet de conclure que, comme les hybrides Mb-[Co(dmgh)₂(H₂O)₂] et Mb-[Co(dmghBF₂)₂(H₂O)₂], la présence du complexe bloque l'insertion de l'hème dans la myoglobine. La formation de l'hybride Mb-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] est donc un processus irréversible.

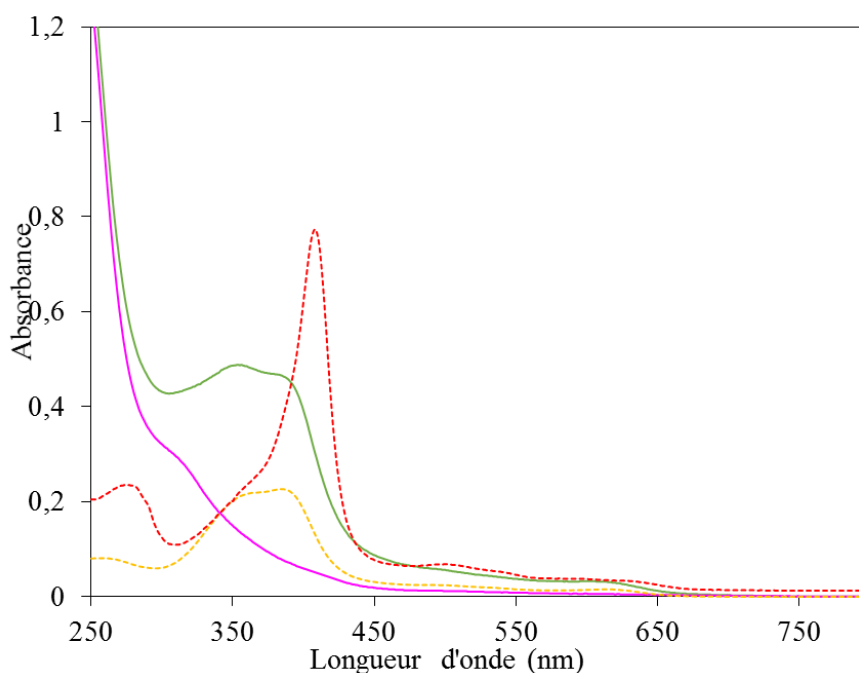


Figure 131. Spectres UV-visible de Mb-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] (rose), de l'holo-myoglobine (rouge), de l'hème libre en solution (jaune) et de Mb-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] en présence d'hème (vert) (à 10 μ M dans du tampon Tris 50 mM pH 7).

Pour finir nous nous sommes intéressés aux structures secondaires de la myoglobine en présence de ce complexe diimine dioxime de cobalt par étude du dichroïsme circulaire. Il ressort du spectre représenté figure 132 que la protéine (en bleu) est structurée avec une

majorité d'hélices alpha comme les formes apo (en rouge) et holo (en rose) de la myoglobine avec cependant une légère différence vers 208 nm ne s'expliquant pas par une différence dans la proportion d'hélices alpha par rapport aux feuillets bêta puisque ce pic n'est pas observé dans les spectres en dichroïsme circulaire caractéristique de ces deux formes comme on a pu le voir figure 123. Entre 190 nm et 200 nm le spectre de l'hybride ressemble plus au spectre de l'apo-myoglobine qu'à celui de la forme holo. Cela peut potentiellement s'expliquer par une proportion d'hélice alpha plus faible dans cet hybride par rapport à l'holo-myoglobine pouvant correspondre à l'absence de structuration de l'hélice F mais également uniquement à une rigidité légèrement plus faible de la protéine puisque la différence observée n'est que légèrement supérieure au bruit de fond.

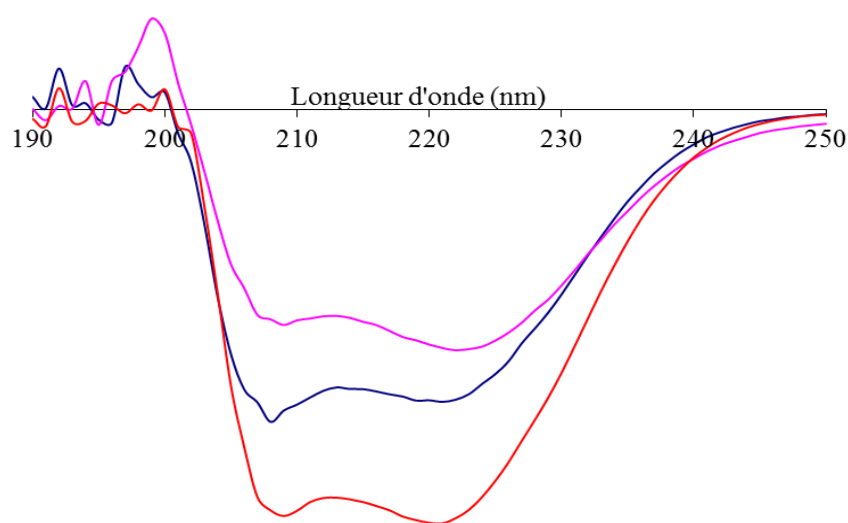


Figure 132. Spectre de dichroïsme circulaire de l'hybride Mb-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] (bleu, 80 μ M dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7.2), de l'apo-myoglobine (rouge, 80 μ M dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7) et de l'holo-myoglobine (rose, 20 μ M dans du tampon Tris/HCl 50 mM pH 7).

Il semble donc que la protéine soit moins structurée en présence de ce complexe diimine dioxime de cobalt qu'en présence des deux cobaloximes décrites précédemment. Néanmoins, l'hybride est formé de manière irréversible, stable et structuré par une majorité d'hélices alpha.

4.3. Etude de la stabilité de l'hybride HO1-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂]

L'hybride HO1-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] a montré en présence d'hème un comportement identique aux deux hybrides basés sur l'hème oxygénase comme enveloppe protéique. L'étude UV-visible nous a permis de conclure qu'environ 55% de la protéine est encore capable de fixer son cofacteur biologique.

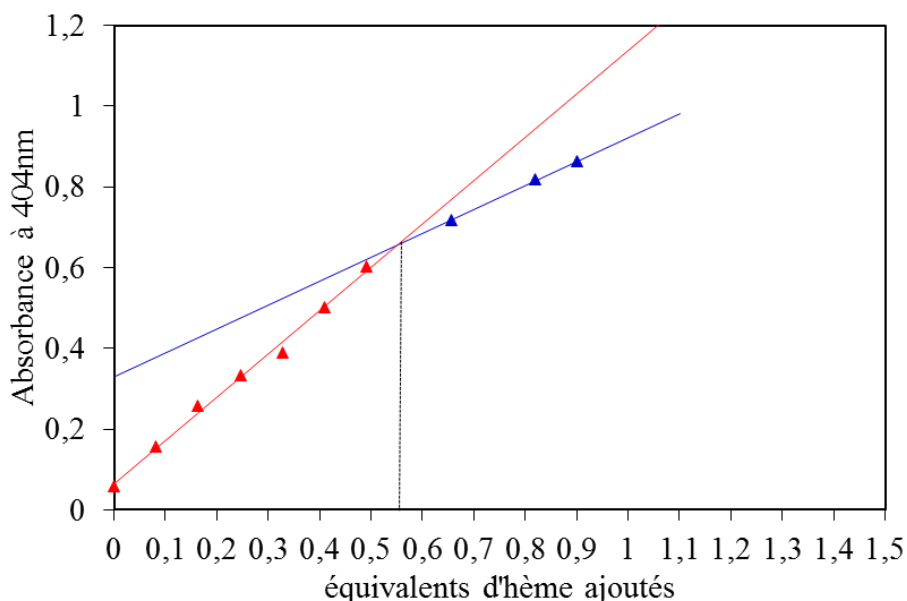


Figure 133. Absorbance à 404 nm d'une solution d'hybride HO1-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] en fonction du nombre d'équivalents d'hèmes ajoutés à la solution. Conditions de mesure et de régression linéaire dans la partie Matériels et Méthodes.

Afin d'avoir une idée du positionnement des complexes dans la protéine nous avons effectué, en parallèle des études présentées plus haut, des études de mécanique moléculaire en collaboration avec Martin Field de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble.

5. Etude de docking

Les études dites de « docking » mettent en jeu une optimisation de géométrie via des calculs théoriques de l'énergie du système protéine + complexe suivant une approche de mécanique moléculaire : différentes positions du complexe sont échantillonnées permettant ainsi de converger vers la position de plus faible énergie du complexe dans la protéine. Pour cela nous avons fixé l'enveloppe protéique et nous avons donné des degrés de liberté aux acides aminés situés à moins de 5 Å du cobalt. Une cobaloxime avec aucun ligand axial a d'abord été positionnée dans l'enveloppe protéique avec une contrainte de distance (distance d'équilibre initiale fixée à 1.9 Å) entre le cobalt et l'azote de l'histidine (pour la myoglobine des calculs d'optimisations sont faits en parallèle avec une contrainte sur l'histidine 64 et sur l'histidine 93). Enfin, après cette première phase d'optimisation, une molécule d'eau a été ajoutée comme deuxième ligand axial du cobalt. Pour finir un calcul de type QM/MM traitant en mécanique quantique la cobaloxime, l'histidine et l'eau ont permis d'affiner la modélisation. Le tableau 7

Chapitre III – Préparation et caractérisation des hybrides

regroupe pour chaque hybride les distances clé comme par exemple la distance entre le cobalt et l'azote de l'histidine proximale.

Hybrides	Distances		
	Co-N(His _p)	Co-O(H ₂ O)	Co-N _{eq} (ligand) (min/max)
HO1-[Co(dm _g BF ₂) ₂ (H ₂ O)]	1,95	2,23	1,89/1,9
HO1-[Co{(DO)(DOH)pn}H ₂ O]	1,86	2,44	1,92/1,96
HO1-[Co(dm _g H) ₂ (H ₂ O)]	1,98	2,22	1,93/2
Mb-[Co(dm _g BF ₂) ₂ (H ₂ O)]	1,97	2,19	1,87/1,9
Mb-[Co{(DO)(DOH)pn}H ₂ O]	1,87	2,46	1,92/1,94
Mb-[Co(dm _g H) ₂ (H ₂ O)]	1,93	2,23	1,93/1,95

Tableau 7. Distances et énergie des différents hybrides. His_p: histidine proximale (His25 pour HO1 et His93 pour Mb), N(ligand): les 4 azotes du plan diimine dioxime (pour [Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂]) et cobaloxime (pour [Co(dm_gH)₂(H₂O)₂] et [Co(dm_gBF₂)₂(H₂O)₂]), H₂O : deuxième ligand axial du cobalt avec l'azote de l'histidine.

Pour la myoglobine ces calculs nous ont permis de confirmer que la position la plus stable des trois complexes dans la protéine correspond à la coordination de l'azote de l'histidine 93 en axial du cobalt et dans aucun des cas à l'histidine 64. De plus pour les hybrides Mb-[Co{(DO)(DOH)pn}(H₂O)] et Mb-[Co(dm_gH)₂(H₂O)] on observe la formation d'une liaison hydrogène entre un atome d'hydrogène de la molécule d'eau et un atome d'azote de l'histidine 64 (histidine distale). Dans le cas de l'hème oxygénase 1 de rat, les complexes sont bien coordonnés à l'histidine 25. Les calculs effectués n'ont pas mis en évidence l'existence de deux positions d'énergie comparable comme cela a été observé en RPE dans le cas de l'hybride HO1-[Co(dm_gBF₂)₂(H₂O)₂], ce qui peut indiquer que les formes HO1 /1 et HO1 /2 correspondent à des repliements de la protéine significativement différents.

Les trois hybrides basés sur la myoglobine ont des structures se superposant quasiment parfaitement à l'exception de légères fluctuations au niveau de l'histidine 64.

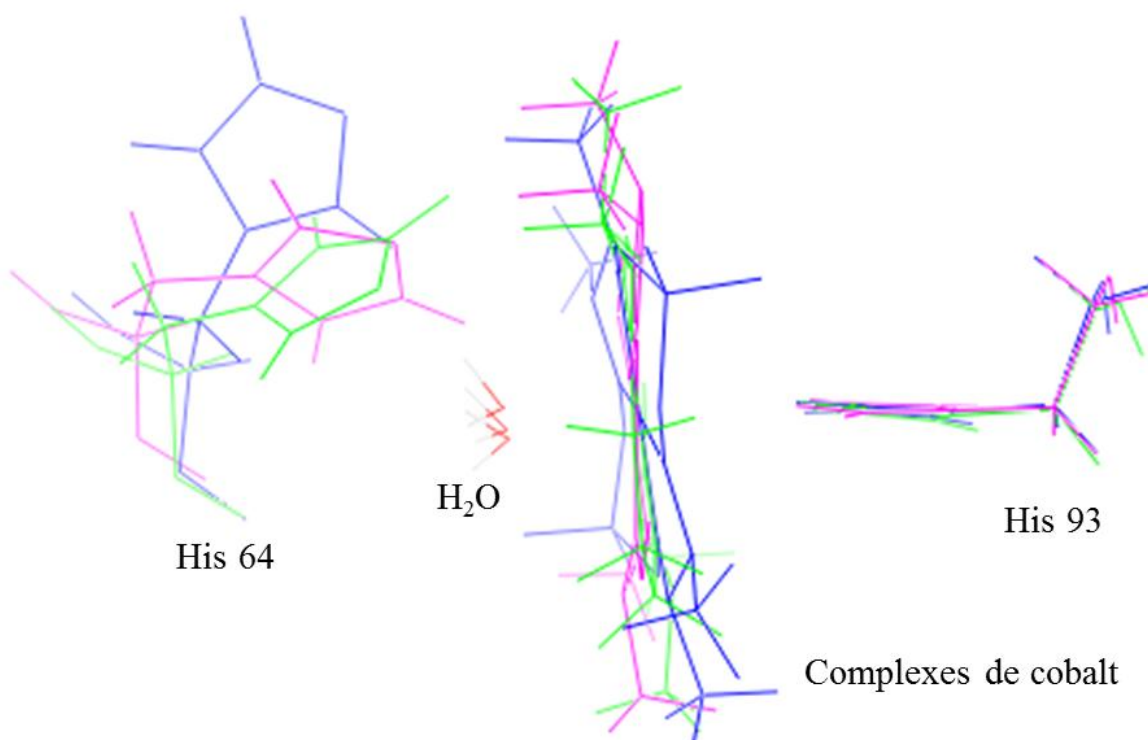


Figure 134. Structure des hybrides Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] en bleu, Mb-[Co(dmgbH)₂(H₂O)₂] en rose et Mb-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] en vert.

On note pour les hybrides basés sur l'hème oxygénase une plus grande fluctuation au niveau de la structure des hybrides. Ainsi, en comparant les trois hybrides basés sur l'hème oxygénase comme protéine hôte on peut constater qu'une partie de la poche hydrophobe se referme autour du complexe particulièrement dans le cas de l'hybride HO1-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] et seulement légèrement dans le cas de l'hybride HO1-[Co(dmgbH)₂(H₂O)₂]. Nous avons pu identifier que cette modification provient d'une orientation différente de la lysine 18 qui se rapproche de l'hélice distale. Ainsi la distance entre la sérine 142 de l'hélice distale avec la lysine 18 de l'hélice proximale passe de 4.7 Å dans l'hybride HO1-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] à 8.2 Å dans l'hybride HO1-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂].

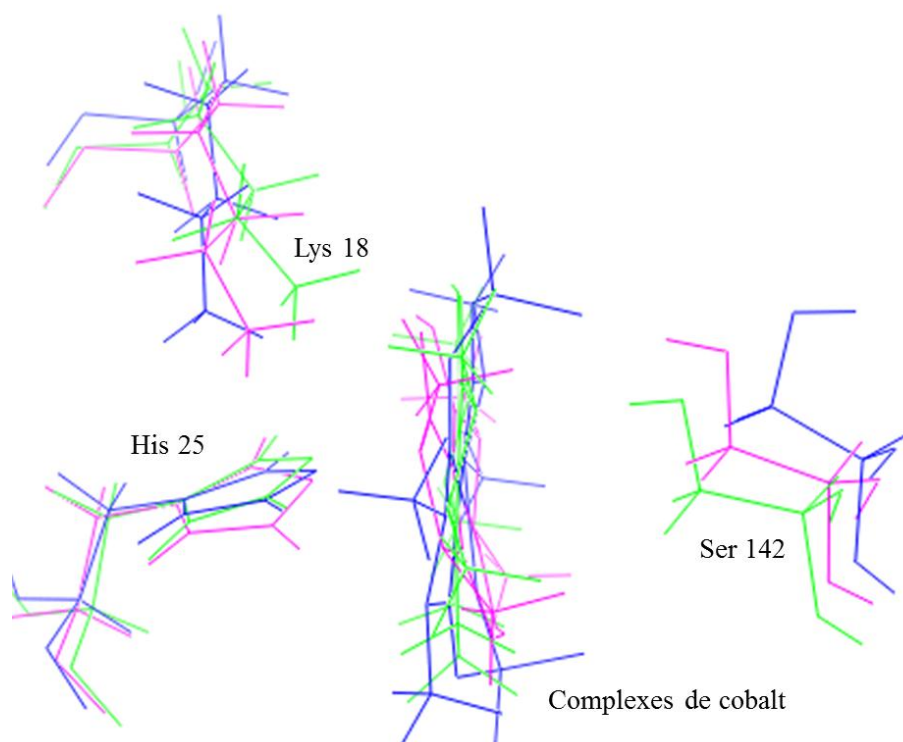


Figure 135. Structure des hybrides HO1-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] en bleu, HO1-[Co(dmgbH)₂(H₂O)₂] en rose et HO1-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] en vert. La molécule d'eau coordonnée au cobalt n'a pas été représentée.

Il est donc possible que les deux formes observées en RPE soient dues à une certaine flexibilité de la poche hydrophobe. Ainsi, lorsqu'elle est plutôt ouverte le complexe est en contact avec le milieu extérieur entraînant l'observation de l'espèce HO1 /1 en RPE alors que, lorsque la poche est plutôt fermée, on obtient l'espèce HO1 /2 caractérisée par un milieu plutôt hydrophobe autour du complexe semblable à celui apporté par la myoglobine. D'après la structure il y a globalement plus de dérivés hydrophiles autour des complexes de cobalt dans la poche de l'hème oxygénase que dans celle de la myoglobine.

Nous obtenons également par cette méthode des informations sur les différentes distances dans les hybrides. Ainsi, on observe une distance entre le cobalt et l'azote de l'histidine proximale entre 1.86 Å et 1.98 Å, semblable à la distance entre le cobalt et les 4 azotes du plan équatorial appartenant au ligand bis-dioximato ou diimine dioximato qui se situe autour de 1.87 Å et 2 Å pour tous les hybrides. On peut noter que les mêmes distances sont obtenues dans le cas du complexe de cobalt (III) [Co(dmgbH)₂pyCl] puisqu'on a pu mesurer à partir de données cristallographique obtenues dans notre équipe que les cinq azotes coordonnés se trouvent à une distance comprise entre 1.88 Å et 1.98 Å du cobalt. La valeur de distance comprise Co-O(H₂O) entre 2.2 Å et 2.46 Å est en accord avec les résultats EXAFS obtenus pour l'hybride Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] (en rouge figure 136) et pour l'hybride Mb-[Co(dmgbH)₂(H₂O)₂] (en

bleu figure 136) pour lequel la transformée de Fourier du spectre EXAFS est similaire à celle de l'hybride Mb-[Co(dm \bar{g} BF $_2$) $_2$ (H $_2$ O) $_2$].

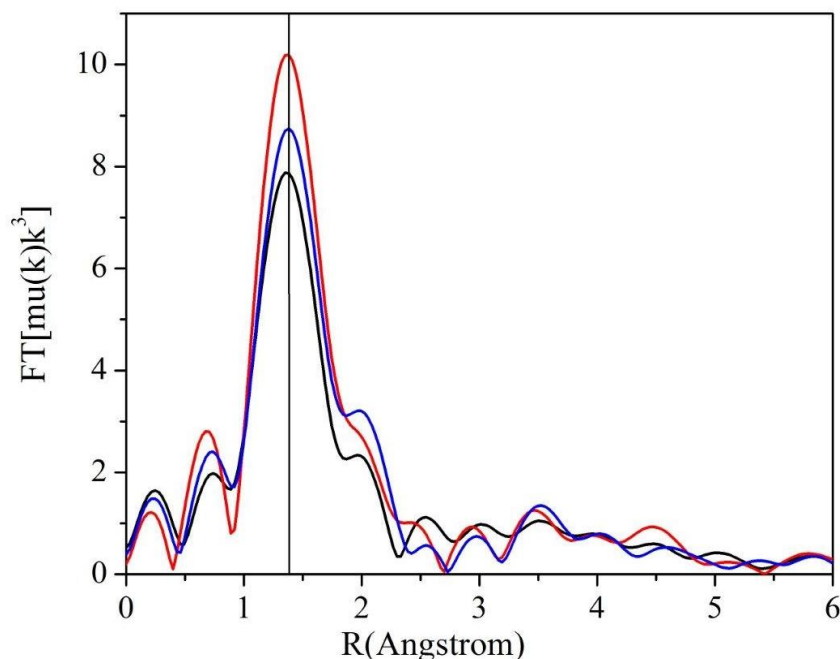


Figure 136. Transformée de Fourier du spectre XAFS de la cobaloxime [Co(dm \bar{g} BF $_2$) $_2$ (H $_2$ O) $_2$] seule (noir) , dans la myoglobine (rouge) et de la cobaloxime [Co(dm \bar{g} H) $_2$ (H $_2$ O) $_2$] dans la myoglobine (bleu)

On peut donc, sur la base des simulations par mécanique moléculaire, interpréter les spectres EXAFS de la manière suivante : Dans le cas des hybrides le pic majoritaire de la transformée de Fourier du signal EXAFS correspond à la présence des quatre ligands azotés du plan équatorial ainsi que de l'histidine coordonnée en équatorial. On a donc bien une augmentation du nombre de ligands les plus proches par rapport au complexe libre. Le second pic vers 2 Å, d'intensité plus faible, correspond à la coordination d'une molécule de solvant (eau ou acétonitrile) dans le cas de la cobaloxime en solution et d'une molécule d'eau dans le cas des hybrides.

L'étude de la structure globale des hybrides confirme cependant que les complexes insérés dans l'hème oxygénase (à droite figure 137) sont plus exposés au milieu extérieur que ceux insérés dans la myoglobine (à gauche figure 137). En effet la cavité de l'hème oxygénase est plus ouverte que celle de la myoglobine comme on peut le voir sur la figure 137 via une représentation de la surface des protéines, permettant de mettre en avant la poche dans laquelle le complexe est inséré. Nous avons choisi de présenter les hybrides avec la cobaloxime [Co(dm \bar{g} BF $_2$) $_2$ (H $_2$ O) $_2$] mais cette différence est également valable pour les deux autres types d'hybrides. Les représentations surfaciques de tous les hybrides sont disponibles en annexe 2.

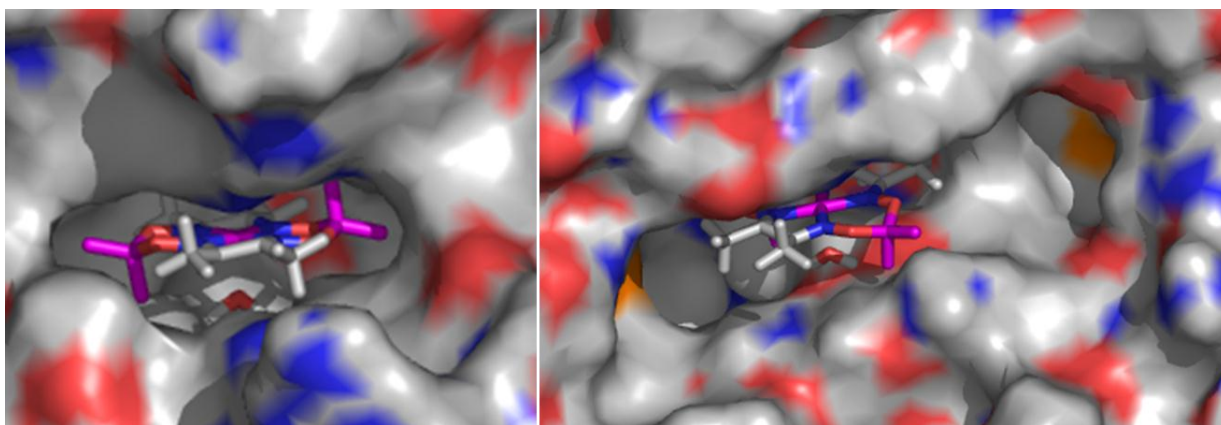


Figure 137. Représentation graphique obtenue par docking de la surface des protéines (la myoglobine de cachalot à gauche et l'hème oxygénase 1 de Rat à droite) dans laquelle est insérée la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgbF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$.

Le point majeur de cette étude est l'identification de l'histidine coordonnée au cobalt pour les hybrides basés sur la myoglobine de cachalot comme enveloppe protéique. Cette étude vient donc appuyer clairement le fait que les complexes de cobalt se positionnent au même endroit que l'hème dans la protéine.

Nous avons présenté dans ce chapitre les résultats ayant apporté des informations sur les hybrides entre la myoglobine ou l'hème oxygénase et des complexes de cobalt. Deux méthodes souvent utilisées pour caractériser des systèmes hybrides protéine-complexe inorganique ont également été testées mais sans donner pour l'instant de résultats concluants.

6. Spectrométrie de masse en conditions non dénaturantes

La première méthode est la spectrométrie de masse en conditions non dénaturantes. Cette technique permet d'observer le spectre de masse de la protéine couplée à un cofacteur par liaison faible. Tout l'enjeu de cette méthode est de ne pas casser la liaison entre la protéine et son cofacteur afin de pouvoir observer le spectre de masse global.

Des tests préliminaires antérieurs à mon travail avaient été effectués avec la myoglobine de cheval et la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$. On avait alors à ce moment-là obtenu des résultats concluants avec l'observation sur le spectre de masse en conditions non dénaturantes représenté figure 138 d'un pic dont la masse correspondant à la somme de la masse moléculaire de la myoglobine et de la cobaloxime.

La figure 138 montre deux séries de pics, l'une correspondant à une charge globale de la protéine de +9 et l'autre +8. Dans chaque série, le pic de rapport masse sur charge le plus faible

correspond à l'apo-protéine seule (16961,58 Da, attendu 16951,49 Da) puis vient un pic correspondant à la masse d'un adduit complexe-protéine (17284,65 Da, attendu 17276,6 Da) et enfin un pic correspondant à la protéine entière (avec son hème, fractions résiduelle d'holo-myoglobine présente dans l'échantillon testé) (17578,74 Da, attendu 17567,49)

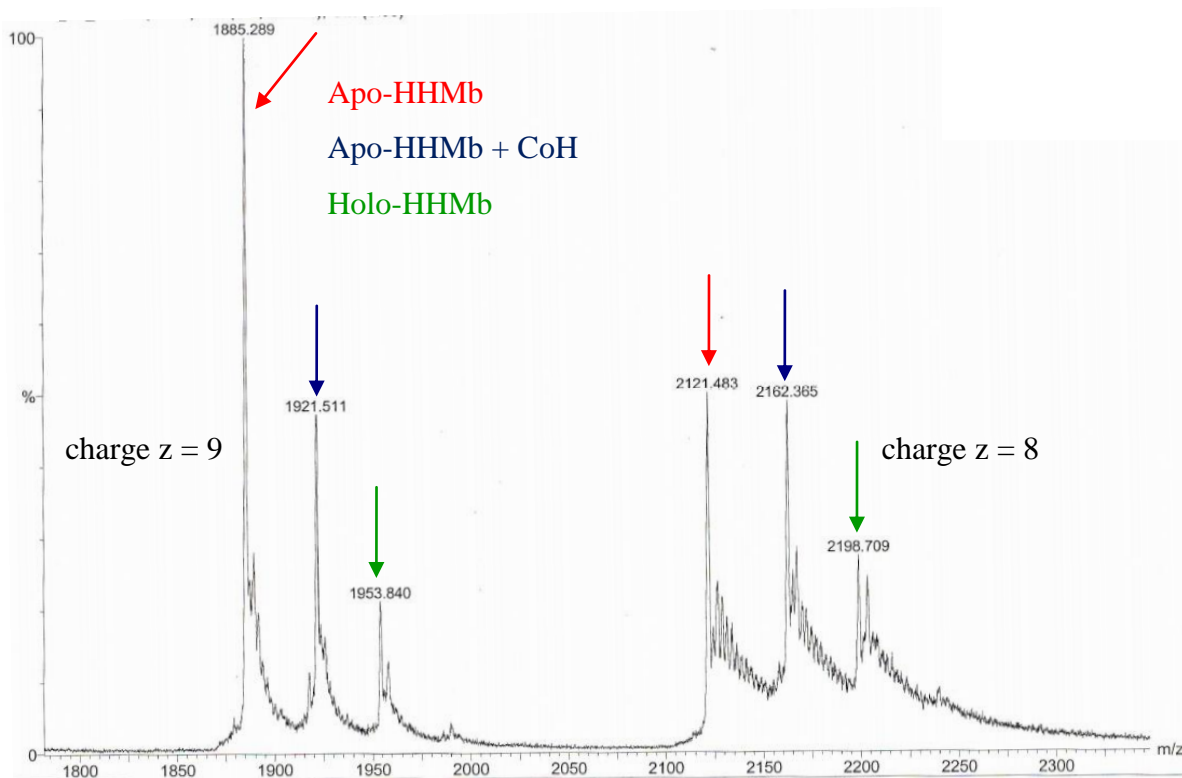


Figure 138. Spectre de masse ESI-TOF d'un échantillon de myoglobine de cheval incubé avec le complexe $\text{Co}(\text{dmgh})_2(\text{H}_2\text{O})_2$ puis passé sur colonne d'exclusion stérique (24 μM dans l'acétate d'ammonium 50 mM pH 7). $m/z=1885,289$, $m=16961,58\text{Da}$ $z=9$; $m/z=1921,511$ $m=17284,65\text{Da}$ $z=9$; $m/z=1953,840$ $m=17578,74\text{Da}$ $z=9$; $m/z=2121,483$ $m=16961,58\text{Da}$ $z=8$; $m/z=2162,365$ $m=17284,65\text{Da}$ $z=8$; $m/z=2198,709$ $m=17578,74\text{Da}$ $z=9$.

Cette technique peut donc apporter des résultats concluants mais elle reste très sensible à la fois à la préparation de l'échantillon et à la nature du complexe et de la protéine.

Il s'avère que malgré nos efforts cette technique n'a pas donné de résultats satisfaisants avec les hybrides obtenus à partir de la myoglobine de cachalot. Il s'est avéré en effet nécessaire d'éliminer toutes traces de tampon Tris dans les échantillons et de travailler en tampon acétate d'ammonium. Le changement de tampon a été fait à la fois avant et après préparation de l'hybride mais dans les deux cas aucun signal n'a été observé, cela même avec l'holo-myoglobine.

7. Etude cristallographique

Nous avons finalement entamé des études cristallographiques sur les différents hybrides formés dans le but d'obtenir une structure de la protéine en présence d'un complexe de cobalt et donc de pouvoir corroborer les différentes informations déduites des nombreuses expériences présentées au cours de ce chapitre.

Pour les hybrides à base de myoglobine ces travaux ont été réalisés en collaboration avec Christine Cavazza de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble. Par facilité nous avons travaillé dans un premier temps en condition aérobie après formation et concentration des hybrides Mb-[Co(dmgh)₂(H₂O)₂], Mb-[Co(dmghBF₂)₂(H₂O)₂] et Mb-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] en absence d'oxygène. Nous avons pu remarquer que dans la littérature^{152,194-196} les conditions expérimentales dans lesquelles des cristaux de myoglobine, de mutants ou d'hybride ont été obtenus sont très variées. Cette constatation nous a amené dans un premiers temps à tester des conditions standard de cristallisation c'est-à-dire un échantillonnage de différentes conditions de pH et d'agent précipitant (concentration croissante d'acétate d'ammonium ainsi que concentration croissante en PEG 6000). Ces premiers tests n'ont pas été concluants mais ont confirmé le fait que la bonne gamme de concentration en protéine a été utilisée puisque les gouttes étaient à la fois limpides en conditions les plus diluées en agent précipitant et précipitées pour les conditions les plus concentrées. Ces constatations nous ont amené à modifier la méthode de préparation des échantillons protéiques afin qu'ils soient plus stables (en optimisant la concentration en protéine avant ajout de 2 équivalents de complexe dilué dans du DMSO) puis dans un second temps à élargir les conditions de cristallisation testées en utilisant alors un robot de cristallisation en condition anaérobie. Malgré le test de plus de 600 conditions nous n'avons pas été encore en mesure d'obtenir de cristaux diffractant pour les divers hybrides testés.

Nous avons également mené des études de cristallisation des hybrides à partir d'hème oxygénase 1 de rat (HO1) et d'hème oxygénase de *Corynebacterium diphtheriae* (HmuO) en collaboration avec Ludovic Pecqueur au Laboratoire de Chimie des Processus Biologiques dirigé par Marc Fontecave (Unité CNRS/Collège de France FRE3488). Après étude des données présentes dans la littérature^{162,163,197} nous avons appliqué le même protocole de travail qu'avec la myoglobine consistant à échantillonner différents agents précipitant (PEG 4000 pour HO1, PEG 2000 et sulfate d'ammonium pour HmuO) et différents pH. Ces tests n'ayant pas été concluants nous avons testé différentes conditions en kit par robot en condition aérobie. Des cristaux maclés ont bien été obtenus (plus particulièrement pour HO1-[Co(dmgh)₂(H₂O)₂] et

HO1-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] dans les conditions suivantes: PEG 4K, Tris 0.1M pH 8.5, MgCl₂ 0.15-0.2 M) (figure 139). Malgré l'emploi de différents additifs disponibles en kit, il n'a pas été possible à ce jour d'obtenir des monocristaux de ces hybrides. La présence de cobalt dans ces cristaux protéiques a cependant été confirmée par fluorescence X à la fois pour les cristaux de HO1-[Co(dmgbH)₂(H₂O)₂] et de HO1-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂].

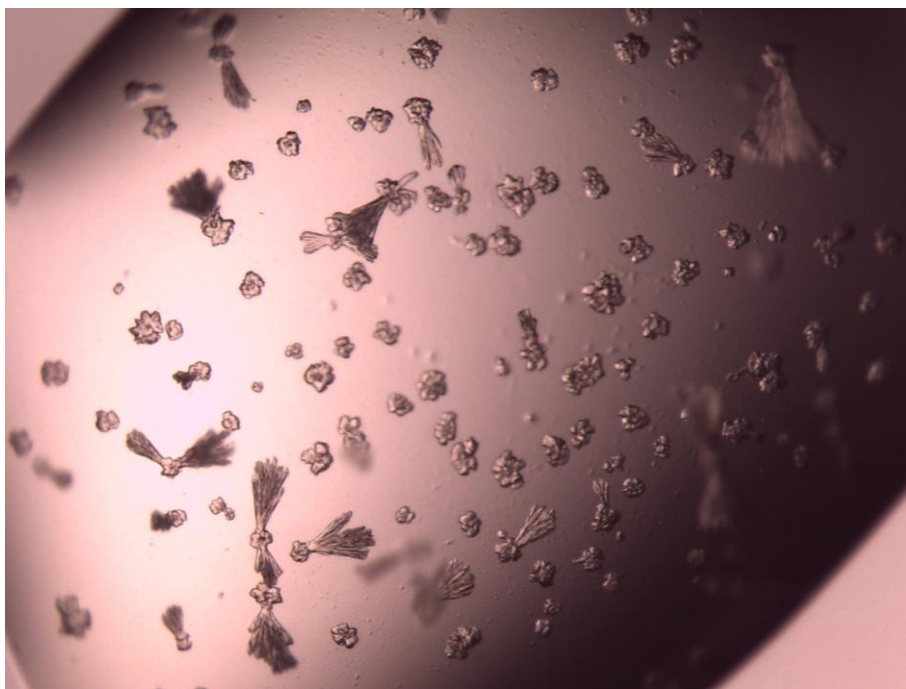


Figure 139. Cristaux obtenus pour les hybrides HO-[Co(dmgbH)₂(H₂O)₂] dans les conditions PEG 4K, Tris 0.1M pH 8.5, MgCl₂ 0.15-0.2 M.

Les problèmes rencontrés pour ces différents essais de cristallisation peuvent être dus à la perte partielle de cobalt observée lors de la concentration des échantillons d'hybride puisque cela amène en effet à une forme de non homogénéité de l'échantillon.

8. Conclusion

Malgré l'absence de structure cristallographique, nous avons montré au cours de ce chapitre en utilisant différentes techniques d'analyses, que nous avons réussi à former des hybrides à partir de myoglobine, d'hème oxygénase 1 de rat et de différents complexes de cobalt connus pour leur activité pour la catalyse de réduction de protons.

Nous avons pu mettre en évidence une bonne affinité des complexes de cobalt pour la myoglobine de cachalot et l'hème oxygénase 1 de rat. Les complexes de cobalt interagissent avec les protéines via la coordination de l'azote d'une histidine en axial (l'histidine 93 d'après les études de docking dans la myoglobine et l'histidine 25 dans l'hème oxygénase 1 de rat).

Chapitre III – Préparation et caractérisation des hybrides

Cette analyse laisse supposer qu'il est possible d'étendre les résultats obtenus aux hybrides basés sur d'autres hémoprotéines (HmuO et FixL par exemple, cf. chapitre II) ou basés sur d'autres complexes de cobalt.

Dans tous les cas, les hybrides sont significativement plus sensibles à l'oxydation que les complexes de départ. Partant de complexe de cobalt(II), nous obtenons soit des mélanges d'espèces Co(II) et Co(III), soit des hybrides de Co(III). Ces hybrides ont de plus montré une très bonne stabilité et une faible modification de la structure générale de la protéine. Enfin, l'enveloppe protéique autour du complexe de cobalt modifie son environnement proche de manière suffisamment significative pour que l'on puisse observer des modifications spectroscopiques.

- CHAPITRE IV -

Etudes électrochimiques et catalytiques

Lors du chapitre III nous avons décrit la préparation et la caractérisation de différents hybrides à partir de l'insertion de trois complexes de cobalt dans différentes enveloppes protéiques (principalement la myoglobine de cachalot et l'hème oxygénase 1 de rat). Dans ce chapitre nous nous intéresserons dans un premier temps à leurs propriétés électrochimiques puis à leurs activités catalytiques en solution qui dépendent à la fois du potentiel électrochimique du couple Co(II)/Co(I) mais également d'autres paramètres comme par exemple la cinétique de la réaction ou la stabilité du catalyseur au long du cycle catalytique. Les potentiels ont été mesurés en solution aqueuse par rapport à l'électrode de référence au calomel saturé (ECS) et seront rapportés dans cette thèse par rapport à l'électrode normale à hydrogène (ENH, potentiel de l'ECS = + 0.24V à 25°C par rapport à ENH). Les potentiels mesurés en milieux organiques ont été mesurés et seront rapportés par rapport à l'électrode de référence (Ag/AgCl/KCl 3M).

1. Caractérisation électrochimique

1.1. Généralités

Le point clé de l'étude de protéines par méthode électrochimique est leur immobilisation sur la surface d'une électrode. En effet les études électrochimiques en solution nécessitent des concentrations en espèces électroactives de l'ordre du millimolaire ce qui est peu en accord avec l'utilisation de protéines à cause d'une part de la plus grande difficulté à les produire par rapport aux composés synthétiques et d'autre part de la relativement faible stabilité des solutions protéiques à ces fortes concentrations. L'immobilisation de la protéine sur la surface de l'électrode permet de s'affranchir de ces problèmes et de travailler avec des quantités beaucoup plus faibles de protéine en optimisant le transfert électronique entre l'électrode et le site électroactif, souvent enfoui au sein de la structure protéique isolante. D'un point de vue plus général, l'immobilisation sur surface est une méthode de choix pour le développement de piles à combustible basées sur des enzymes comme catalyseurs (à la fois anodique et cathodique).¹⁹⁸ La méthode utilisée pour immobiliser une protéine dépend de sa nature. En effet, certaines protéines interagissent naturellement avec les électrodes de travail, comme par exemple les hydrogénases avec les électrodes d'or ou de carbone.¹⁹⁹ L'étude électrochimique réalisée lors de cette thèse et les résultats présentés ci-dessous concernent la myoglobine de cachalot. Cette protéine est connue pour ne pas établir d'interaction particulière avec les supports carbonés utilisés communément au laboratoire.

Certaines études de la littérature²⁰⁰⁻²⁰² relatent l'étude électrochimique de l'holo-myoglobine de cheval et de cachalot. Ainsi Wei Sun et ses collaborateurs²⁰¹ ont mis au point en 2009

un procédé pour l'immobilisation de la myoglobine sur des électrodes particulières construites à partir d'un mélange de liquide ionique, de paraffine et de poudre de graphite. Une fois l'électrode préparée, des nanotubes de carbone y sont déposés par évaporation d'une goutte de solution de nanotubes. La myoglobine peut alors être immobilisée par interaction avec les nanotubes. Enfin, une couche de nafion est déposée par-dessus afin de protéger le film de protéine.

Nous avons donc décidé de nous inspirer de ce protocole afin de préparer une électrode modifiée à base de nanotubes de carbone nous permettant d'observer le signal électrochimique des complexes insérés dans la myoglobine. L'optimisation du protocole a été faite à partir de l'holo-myoglobine.

1.2. Etude de l'holo-myoglobine, préparation de l'électrode et étude du greffage

Nous décrivons dans la partie Matériels et Méthodes le protocole précis de préparation de ces électrodes. Succinctement des nanotubes de carbone (CNT) sont déposés sur une électrode de carbone vitreux (ECV) puis une goutte de protéine est déposée et on laisse la solution sécher lentement à température ambiante. Une couche de nafion (Naf) est alors ajoutée en suivant le même protocole.

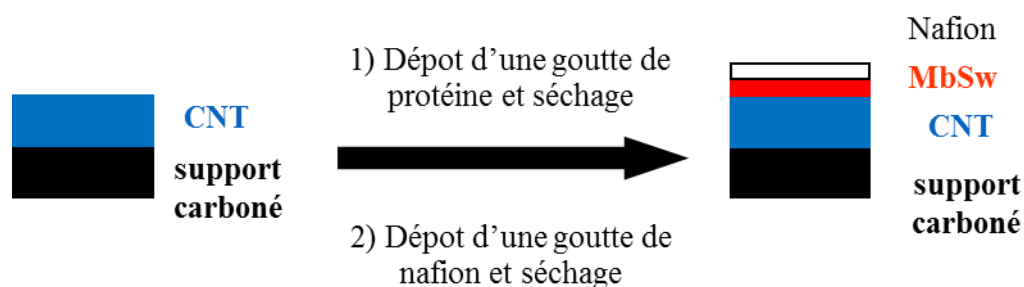


Figure 140. Protocole de fabrication d'électrode pour l'étude électrochimique d'espèces électroactives insérées dans la myoglobine.

Nous étudions alors l'espèce électroactive par voltammétrie cyclique en utilisant l'électrode ainsi formée.

Les électrodes fabriquées par cette technique seront nommées par la suite selon les acronymes suivant : ECV/CNT/protéine en absence de nafion ou ECV/CNT/protéine/Naf en présence de nafion. Par souci de clarté les abréviations suivantes seront utilisées pour les complexes de cobalt ainsi que pour la myoglobine : CoH pour $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, CoBF₂ pour

[Co(dm \bar{g} BF $_2$) $_2$ (H $_2$ O) $_2$], CoD pour [Co{(DO)(DOH)pn}Cl $_2$] et Mb pour la myoglobine de cachalot.

Le signal de voltammétrie cyclique obtenu avec l'électrode ECV/CNT/holo-Mb dans du tampon phosphate de potassium 100mM est représenté figure 141.

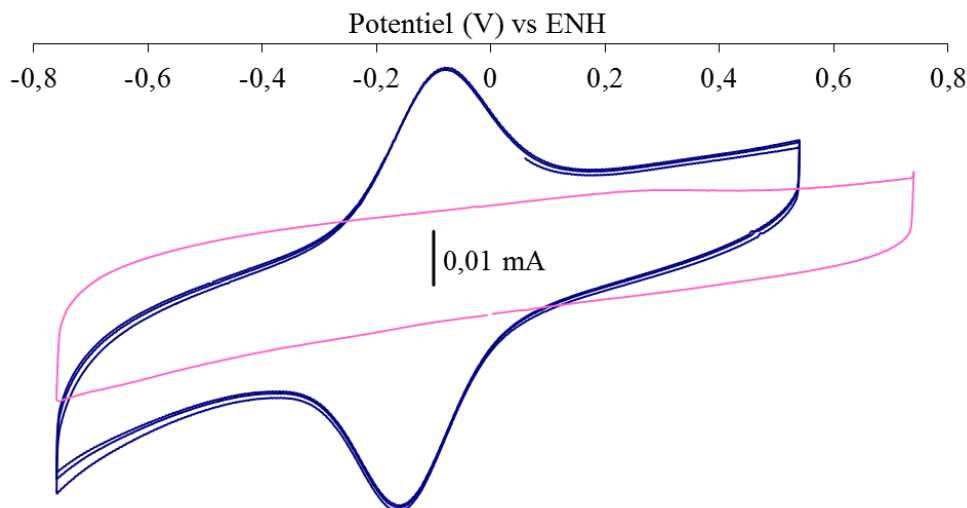


Figure 141. Voltammogrammes cycliques obtenus avec une électrode de travail ECV/CNT/holo-Mb (bleu) ou ECV/CNT (rose) dans du tampon phosphate de potassium 100 mM.

Une vague électrochimique réversible est observée au potentiel de -0.17 V par rapport à l'électrode normale à hydrogène dans du tampon phosphate de potassium 100 mM, ce qui est en accord avec la valeur décrite dans la littérature.²⁰² L'espèce électroactive insérée dans la myoglobine est donc fixée sur l'électrode grâce à l'affinité de la protéine pour les nanotubes de carbone. Le dépôt est, de plus, stable dans le temps puisque on n'observe pas de modification du signal après au moins cinq cycles.

La dépendance de l'intensité des vagues mesurées en voltammétrie dépend, entre autre, du processus de diffusion de l'espèce électroactive au voisinage de l'électrode. Ainsi, l'intensité des vagues est proportionnelle à la racine carrée de la vitesse de balayage lorsque l'espèce électroactive, libre en solution, diffuse vers la surface de l'électrode. Lorsque l'espèce est greffée sur l'électrode, l'intensité des vagues dépend linéairement de la vitesse de balayage.

Les voltammogrammes cycliques obtenus avec différentes vitesses de balayage en potentiel (vitesse de balayage) sont représentés figure 142.

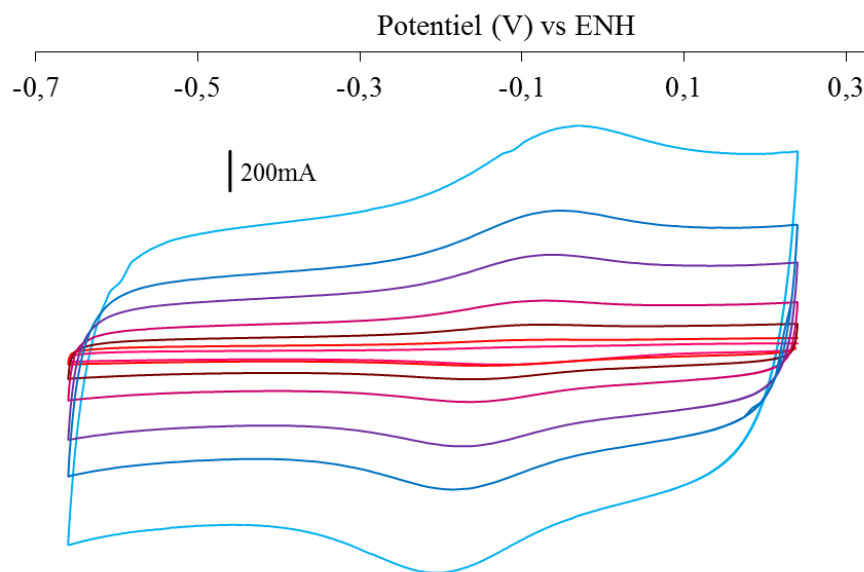


Figure 142. Voltammogrammes cycliques obtenus avec une électrode de travail GDL/CNT/holo-Mb/Naf dans du tampon phosphate de potassium 100mM avec différentes vitesses de balayage (10 mV/s - 20 mV/s - 50 mV/s - 100 mV/s - 200 mV/s - 300 mV/s - 500 mV/s). GDL : Gaz Diffusion Layer utilisé comme support des électrodes à la place du carbone vitreux.

Comme on peut le voir sur la figure 143, dans ce cas, on obtient une variation linéaire de l'intensité des pics anodique et cathodique en fonction de la vitesse de balayage.

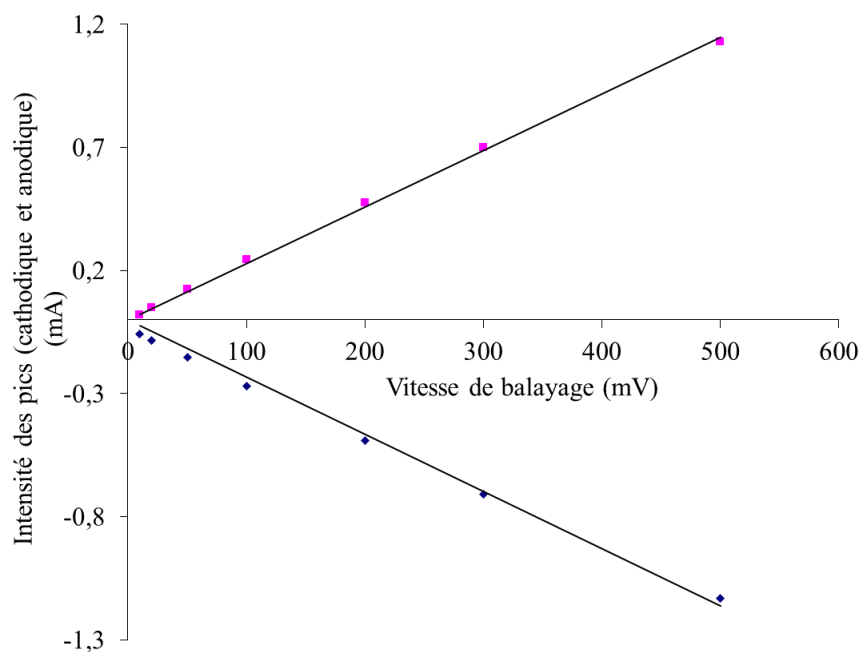


Figure 143. Intensité (mA) des pics anodique et cathodique des voltammogrammes cycliques en fonction de la vitesse de balayage (mV).

On peut noter que la seule observation du signal prouvait que l'holo-myoglobine est greffée à la surface car la quantité de protéine déposée sur l'électrode serait beaucoup trop faible pour pouvoir être détectée par électrochimie si celle-ci était relarguée en solution.

1.3. Etude de l'hybride Mb-[Co(dmgBF₂)₂(H₂O)₂] (MbCoBF₂)

La première étape, une fois la méthode validée avec l'holo-myoglobine, a consisté à étudier l'influence de la couche protectrice de nafion sur le dépôt de protéine. Nous avons donc étudié le signal obtenu avec une électrode ECV/CNT/MbCoBF₂ et avec une électrode ECV/CNT/MbCoBF₂/Naf dans du tampon Tris/HCl 100 mM + NaCl 100 mM pH 7.5. La figure 144 montre le signal obtenu sans nafion (bleu) et avec nafion (rouge). Comme on peut le voir la présence de nafion permet d'observer un signal électrochimique pour l'hybride. Ceci s'explique potentiellement par le fait que le nafion, en établissant un film protecteur entre le tampon et le dépôt protéique, protège ce dernier d'une diffusion en solution ou d'une dégradation.

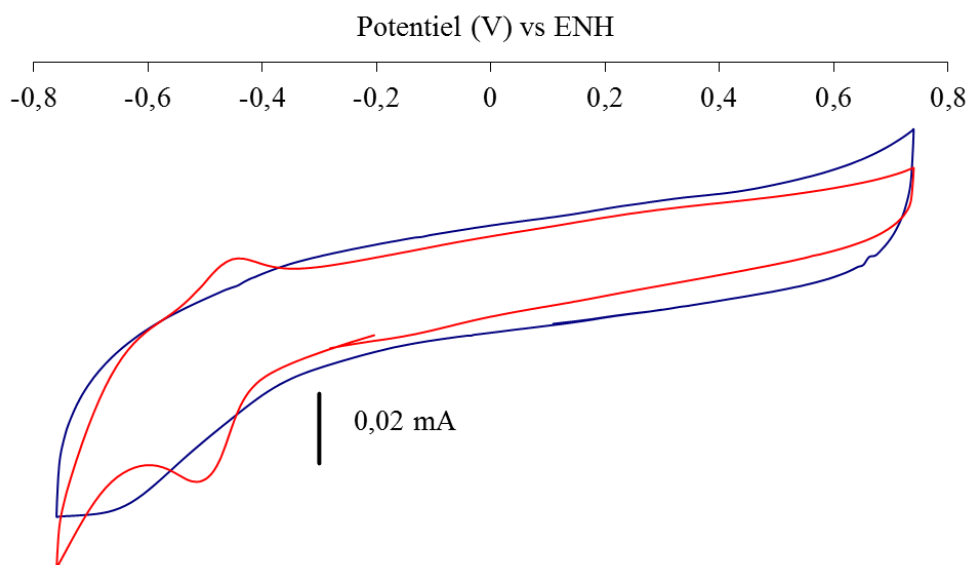


Figure 144. Voltammogrammes cycliques obtenus avec les électrodes de travail ECV/CNT/MbCoBF₂ (bleu) et ECV/CNT/MbCoBF₂/Naf (rouge) dans du tampon Tris/HCl 100 mM + NaCl 100 mM pH 7.5.

Cette étude nous a conduit dans la suite de ce travail à réaliser systématiquement un dépôt de nafion sur le dépôt de protéine lors de la fabrication des électrodes.

Dans le cas de l'électrode ECV/CNT/MbCoBF₂/Naf, nous avons pu observer, lors du premier cycle, une vague électrochimique avec un potentiel de demi-vague de -0.48 V par rapport à l'électrode normale à hydrogène comme nous pouvons le voir figure 145. Lorsque nous faisons un dépôt de [Co(dmgBF₂)₂(H₂O)₂] à la place de l'hybride Mb-[Co(dmgBF₂)₂(H₂O)₂],

que ce soit avec ou sans nafion, on n'observe pas de signal en électrochimie ce qui nous prouve bien que le signal observé correspond à un complexe en interaction avec la structure protéique et donc localisé au sein de l'hybride.

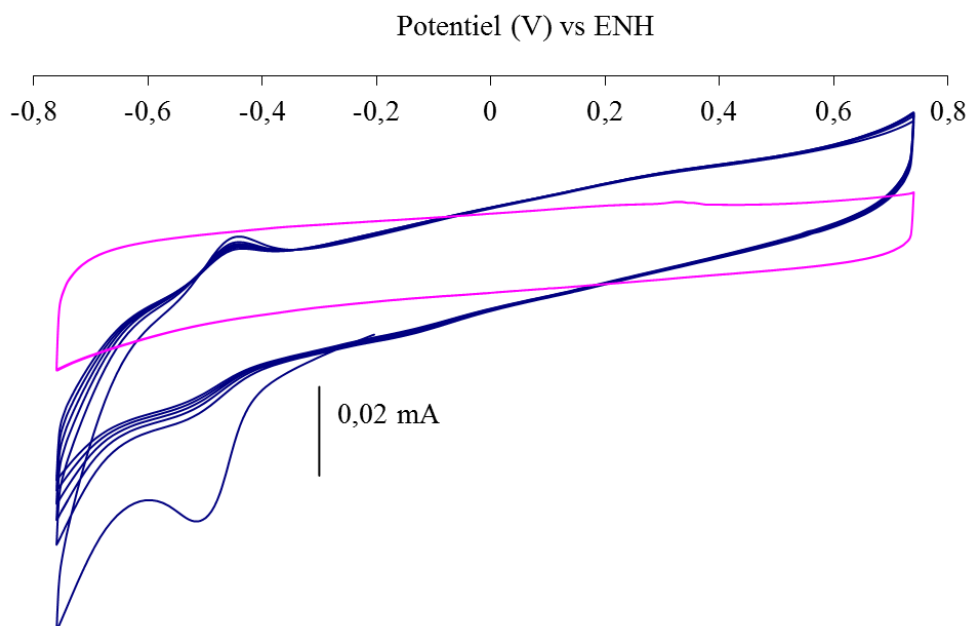


Figure 145. Voltammogrammes cycliques obtenus avec les électrodes de travail ECV/CNT/MbCoBF₂/Naf (bleu) et avec l'électrode de travail ECV/CNT/Naf (rose) comme contrôle dans du tampon Tris/HCl 100 mM + NaCl 100 mM pH 7.5.

Cette vague correspond au couple Co(II)/Co(I) par analogie aux voltammogrammes de ce complexe en milieux organiques. Le pic cathodique de cette vague électrochimique s'efface de manière importante après un cycle de potentiel alors que le pic anodique reste observable. Cela peut s'expliquer par une dégradation du complexe lors du premier cycle entraînant la formation d'une espèce électrochimique dont la signature est une vague irréversible. Il y a donc une faible stabilité du complexe [Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] dans la myoglobine vis-à-vis des cycles de potentiel mais cette dernière est suffisante pour qu'on puisse mesurer le potentiel électrochimique du couple Co(II)/Co(I).

La vague électrochimique correspondant au couple Co(III)/Co(II), située vers des potentiels plus élevés, n'est pas visible ou mal résolue dans notre cas ce qui arrive dans certaines conditions expérimentales pour de nombreuses cobaloximes.¹² C'est le cas, par exemple, pour le complexe [Co(dmgbF₂)₂pyCl] lorsque le voltammogramme cyclique est mesuré au moyen d'une électrode de carbone vitreux dans l'acétonitrile (en noir figure 146). L'ajout de nanotubes de carbone à la surface de l'électrode (en rose figure 146) permet de l'observer, ce qui montre combien ce processus dépend de l'étape de transfert d'électrons à l'interface entre l'électrode et l'espèce électroactive. L'efficacité de ce transfert est probablement largement

affectée lorsque le complexe de cobalt est isolé des nanotubes de carbone par la structure protéique dans les hybrides.

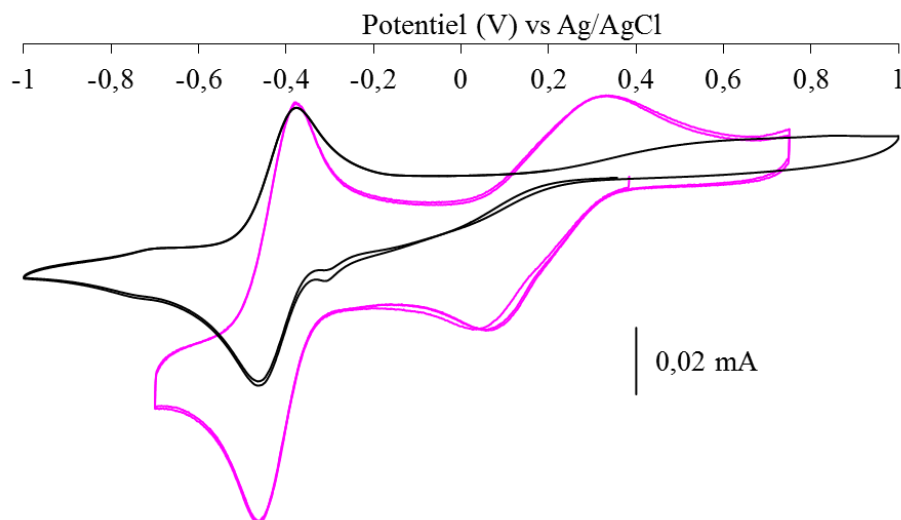


Figure 146. Voltammogrammes cycliques du complexe $[\text{Co}(\text{dmgbF}_2)_2\text{pyCl}]$ en solution à 2mM dans l'acétonitrile avec l'électrolyte TBA/TFB mesurés avec une électrode de travail ECV/CNT (rose) ou ECV (noir).

Le complexe de Co(III) $[\text{Co}(\text{dmgbF}_2)_2\text{pyCl}]$ (py= pyridine), permet de mimer la coordination d'un ligand azoté, comme l'histidine dans les hybrides, au complexe $[\text{Co}(\text{dmgbF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et peut donc servir de mime du complexe dans l'enveloppe protéique. Dans l'acétonitrile en l'absence de nanotubes de carbone déposés sur l'électrode, nous pouvons observer une vague électrochimique, correspondant au couple Co(II)/Co(I) avec un potentiel de -0.4 V par rapport à l'électrode de référence Ag/AgCl_{sat}. En présence de nanotubes de carbone, le potentiel de ce couple ne change pas et une seconde vague électrochimique devient clairement visible, correspondant au couple Co(III)/Co(II) avec un potentiel de + 0.2 V par rapport à l'électrode de référence Ag/AgCl_{sat} (cette vague est également visible en absence de nanotubes de carbone mais elle n'est pas bien résolue).

Cependant ce complexe n'est pas soluble dans l'eau ce qui empêche son étude par voltammétrie cyclique en solution dans les mêmes conditions que les hybrides alors que les potentiels redox sont généralement dépendants du solvant utilisé. De plus la construction d'électrode modifiée avec dépôt d'une solution de complexe (jusqu'à une concentration de 3.3 mM) sur le support ECV/CNT n'a pas permis d'observer un signal électrochimique. Ce résultat peut être expliqué par le fait que le complexe de cobalt seul n'interagit ni avec les nanotubes de carbone ni avec l'électrode de carbone vitreux. Il semble donc que le complexe déposé sur les nanotubes de carbone soit immédiatement relargué en solution une fois l'électrode immergée. Ainsi, bien que le dépôt de Mb- $[\text{Co}(\text{dmgbF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ sur l'électrode ne soit pas suffisamment

stable pour réaliser une étude en vitesse de balayage pour que l'on puisse valider le greffage, la comparaison avec le comportement du complexe seul, déposé dans des conditions similaires à l'hybride, permet d'affirmer que celui-ci interagit bien avec l'électrode. La vague réversible observée figure 144 correspond donc bien au couple Co(II)/Co(I) du complexe inséré au sein de l'apo-myoglobine. Du fait de l'insolubilité de $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2\text{pyCl}]$ en solution aqueuse, nous avons donc décidé d'étudier l'influence de l'enveloppe protéique sur les caractéristiques électrochimiques du complexe via l'étude par voltamétrie cyclique du complexe $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ en solution dans du tampon Tris/HCl 100 mM + 100 mM NaCl. L'utilisation d'une électrode de travail en carbone vitreux modifiée préalablement avec un dépôt de nanotubes de carbone à sa surface (ECV/CNT) nous permet de nous placer dans les conditions d'étude des hybrides. La comparaison du signal obtenu dans ces conditions avec celui obtenu avec l'électrode de travail ECV nous permet d'étudier l'influence des nanotubes de carbone sur la réponse électrochimique du complexe (figure 147).

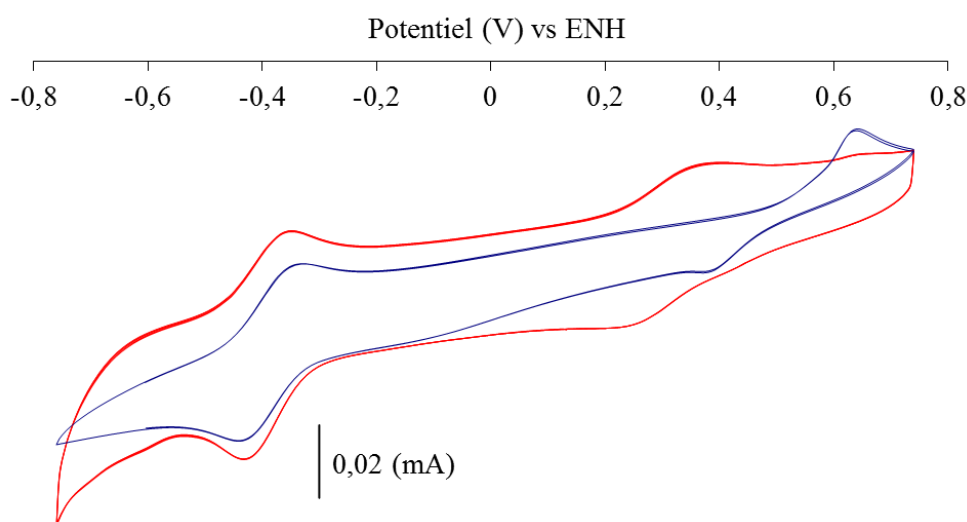


Figure 147. Voltammogrammes cycliques du complexe $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ en solution 1 mM dans du tampon Tris/HCl 100 mM + NaCl 100 mM pH 7.5 mesurés avec une électrode de travail ECV (bleu) ou ECV/CNT (rouge).

La présence de nanotubes de carbone a beaucoup d'influence sur la vague électrochimique correspondant au couple Co(III)/Co(II) mais très peu sur celle correspondant au couple Co(II)/Co(I) qui est, dans les deux cas, observé au potentiel de -0,38 V par rapport à l'électrode normale à hydrogène. Il y a donc un décalage du potentiel du couple Co(II)/Co(I) de + 0,1 V vers les potentiels plus négatifs en présence de l'enveloppe protéique. Ce décalage est l'inverse de celui observé en présence d'une amine coordinante (en présence d'imidazole par exemple) par certains de nos collaborateurs d'Argonne National Lab²⁰³ et confirmé par les mesures représentées figure 148.

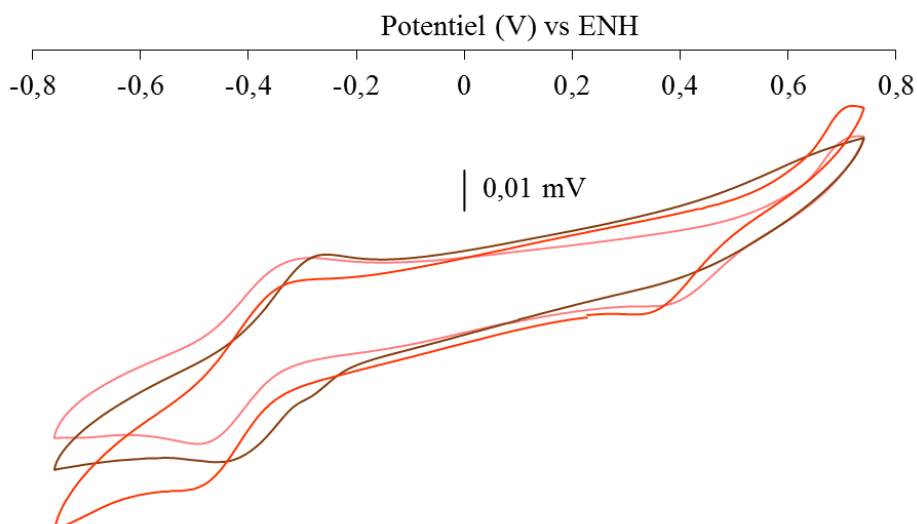


Figure 148. Voltammogrammes cycliques de $[\text{Co}(\text{dmgbF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ en solution à 1 mM dans du tampon Tris/HCl 100 mM + NaCl 100 mM pH 7.5 (rouge), avec 1 équivalent d'imidazole (rose) et avec 10 équivalents d'imidazole (marron).

L'ajout d'un puis de dix équivalents d'imidazole dans la solution décale le potentiel du couple Co(II)/Co(I) vers des potentiels plus élevés puisque on obtient un potentiel de -0.38 V vs ENH en absence d'imidazole, -0.37 V vs ENH avec 1 équivalent d'imidazole et -0.34 V vs ENH en présence de 10 équivalents.

Comme cela est résumé dans le tableau 8, la présence de la myoglobine, coordonnée via l'histidine 93, a un effet différent de la seule présence d'un ligand axial imidazole sur les caractéristiques électrochimiques de la cobaloxime ce qui montre bien l'influence de l'enveloppe protéique dans son intégralité sur les propriétés redox de la cobaloxime.

Espèce électroactive	$[\text{Co}(\text{dmgbF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$	Mb- $[\text{Co}(\text{dmgbF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$	$[\text{Co}(\text{dmgbF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ + imidazole (10eq)
Potentiel électrochimique (vs ENH)	- 0,38 V	- 0,48 V	- 0,34 V

Tableau 8. Potentiels électrochimiques par rapport à l'électrode normale à hydrogène de $[\text{Co}(\text{dmgbF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ dans différents environnements.

1.4. Etude de l'hybride Mb- $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (MbCoH)

Nous avons également étudié l'hybride Mb- $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ par électrochimie. Comme précédemment nous avons pour cela construit une électrode modifiée ECV/CNT/MbCoH/Naf. Le voltammogramme cyclique mesuré avec cette électrode modifiée dans du tampon Tris/HCl

Chapitre IV – Etudes électrochimiques et catalytiques

100 mM + NaCl 100 mM pH 7.5 est représenté figure 149. Comme dans le cas de $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, l'interaction spécifique de la myoglobine avec l'électrode a été vérifiée par l'absence de signal de l'électrode préparée dans les mêmes conditions avec le complexe comme espèce électroactive à la place de l'hybride.

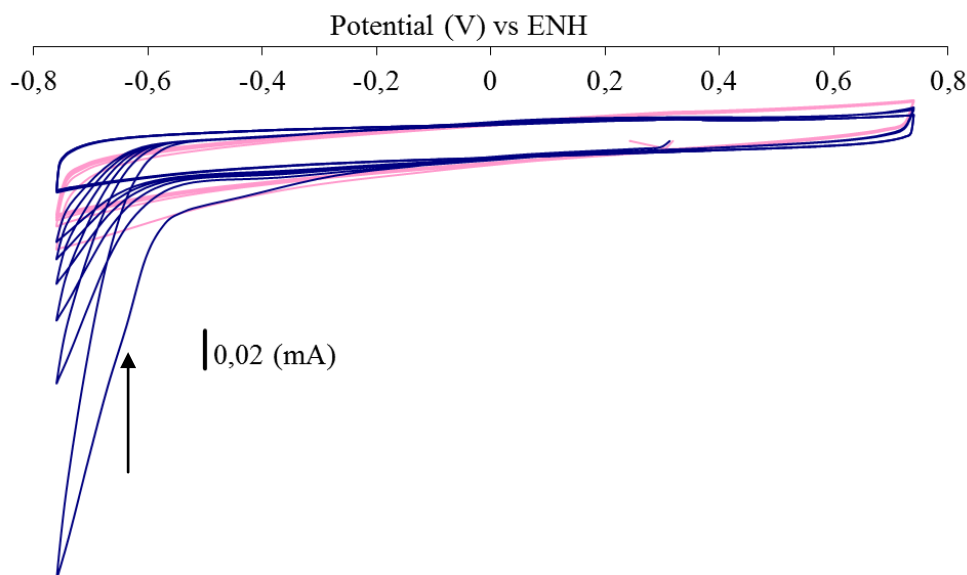


Figure 149. Voltammogrammes cycliques obtenus dans du tampon Tris/HCl 100 mM + NaCl 100 mM pH 7.5 avec une électrode de travail ECV/CNT/MbCoH/Naf (bleu) et ECV/CNT/Naf pour le contrôle (rose).

Comme on peut le voir on n'observe pas de vague électrochimique réversible ou semi réversible avec cet hybride mais une vague irréversible, que nous interprétons comme un courant catalytique de production d'hydrogène. On observe cependant un épaulement sur cette vague catalytique autour de -0.6 V vs ENH qui pourrait correspondre à la vague électrochimique du couple Co(II)/Co(I) couplé à la vague electrocatalytique du couple H^+/H_2 caractérisée par la forte augmentation du courant entre -0.6 V et -0.8 V.

Le décalage du potentiel de l'hybride $\text{Mb-}[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ vers des potentiels plus négatifs par rapport à celui de l'hybride $\text{Mb-}[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ est attendu si l'on compare les cobaloximes $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$.^{12,13}

Il semble donc que dans le cas de l'hybride $\text{Mb-}[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, le potentiel du couple Co(II)/Co(I) soit suffisamment élevé pour que l'on observe également la réaction de réduction de protons en hydrogène. On peut aussi constater que l'intensité de la vague électrochimique diminue fortement lorsqu'on enregistre plusieurs cycles de potentiels. Cela s'explique, comme précédemment, par le fait qu'il y a une dégradation du dépôt au cours de la voltammétrie cyclique. Cette faible stabilité associée à la faible concentration de cobalt présent sur l'électrode ne nous a pas permis de valider la présence d'hydrogène en utilisant cette électrode

pour réaliser une électrolyse à un potentiel de -0.8 V couplée à des mesures en chromatographie en phase gazeuse permettant d'identifier le gaz produit et le quantifier. De plus, seul un faible signal électrochimique a été observé pour le complexe seul en solution dans ces conditions, ne permettant pas de faire la comparaison avec l'hybride comme on a pu le faire dans le cas du complexe $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$.

1.5. Etude de l'hybride Mb-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] (MbCoD)

Enfin nous avons également étudié l'hybride Mb-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] par électrochimie avec une électrode modifiée ECV/CNT/MbCoD/Naf dans du tampon Tris/HCl 100mM + NaCl 100 mM pH 7. Les voltammogrammes obtenus pour 6 cycles de potentiels sont représentés figure 150.

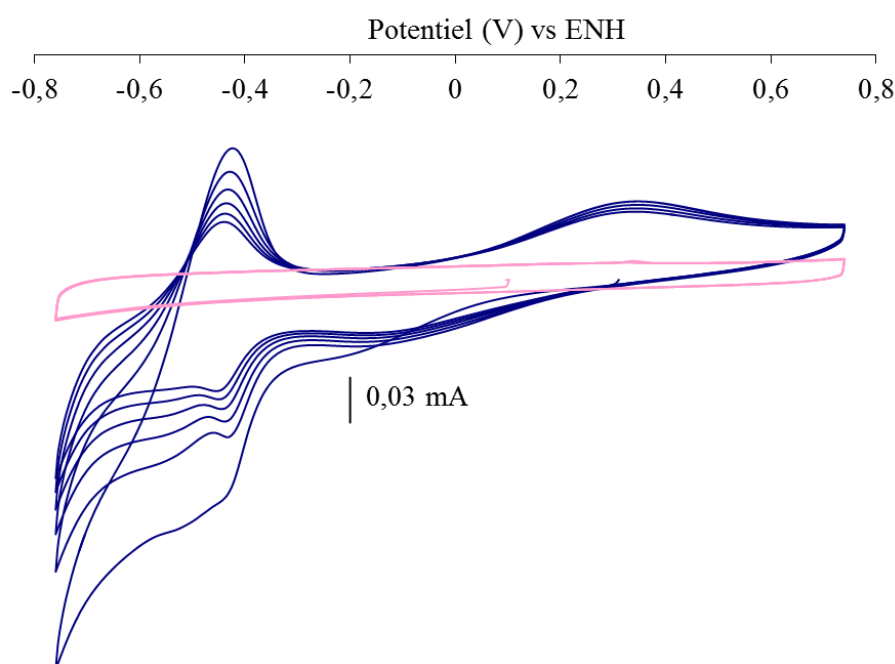


Figure 150. Voltammogrammes cycliques successifs (6 cycles) mesurés dans du tampon Tris/HCl 100 mM + NaCl 100 mM pH 7.5 avec une électrode de travail ECV/CNT/MbCoD/Naf (bleu) et ECV/CNT/Naf pour le contrôle (rose).

On observe un signal quasi-réversible de faible intensité à un potentiel électrochimique de d'environ + 0.12 V vs ENH qu'on associe au couple Co(III)/Co(II). Un deuxième système réversible mieux défini est observé à un potentiel de -0.43 V par rapport à l'électrode normale à hydrogène.

Chapitre IV – Etudes électrochimiques et catalytiques

L'hybride $\text{Mb}[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$ montre une plus grande stabilité que $\text{Mb}[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ puisque le signal reste observable après plusieurs cycles de potentiels. Nous avons donc pu faire varier la vitesse de balayage lors de l'étude et ainsi étudier le phénomène diffusif lié à l'espèce électroactive (figure 151).

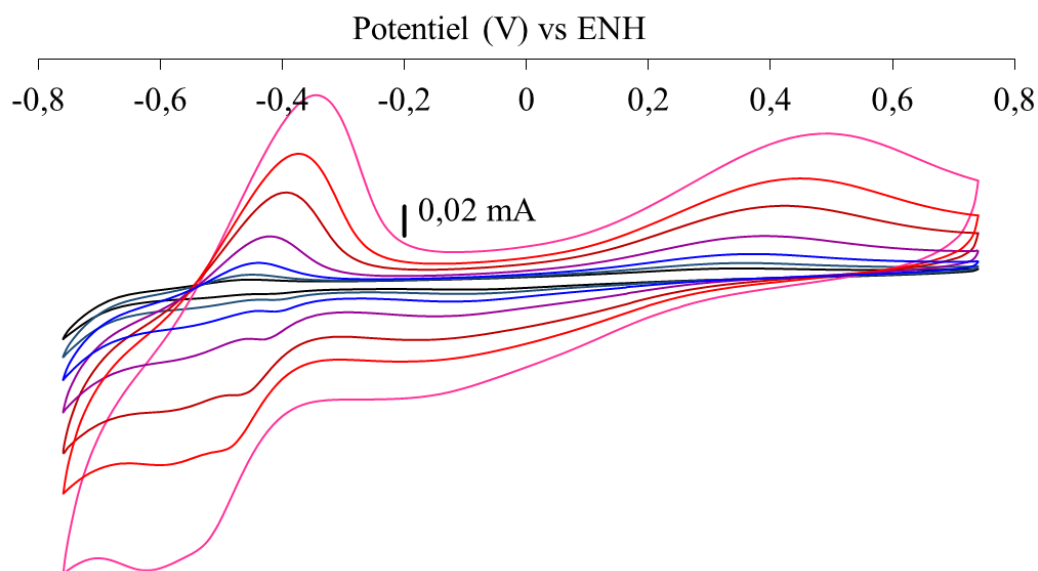


Figure 151. Voltammogrammes cycliques obtenus avec une électrode de travail GDL/CNT/MbCoD/Naf dans du tampon Tris/HCl 100 mM + NaCl 100 mM pH 7.5 avec différentes vitesses de balayage (10 mV/s -20 mV/s -50 mV/s -100 mV/s -200 mV/s -300 mV/s -500 mV/s).

On peut observer pour la vague électrochimique correspondant au couple $\text{Co(II)}/\text{Co(I)}$ deux pics cathodiques. Nous n'avons pas pour l'instant d'explication claire de ce phénomène. Nous décidons de considérer pour notre étude le pic le plus marqué c'est-à-dire celui avec le potentiel le moins négatif. Le deuxième pic peut correspondre à une impureté ou à un produit de décomposition puisque l'intensité de la seconde vague cathodique ne varie quasiment pas avec la vitesse de balayage. L'étude de l'intensité des pics cathodique et anodique de la vague électrochimique correspondant au couple $\text{Co(II)}/\text{Co(I)}$ en fonction de la vitesse de balayage, représentée figure 152, nous prouve que l'espèce électroactive (c'est-à-dire l'hybride $\text{Mb}[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$) est bien greffée sur l'électrode. En effet l'intensité varie linéairement en fonction de la vitesse de balayage.

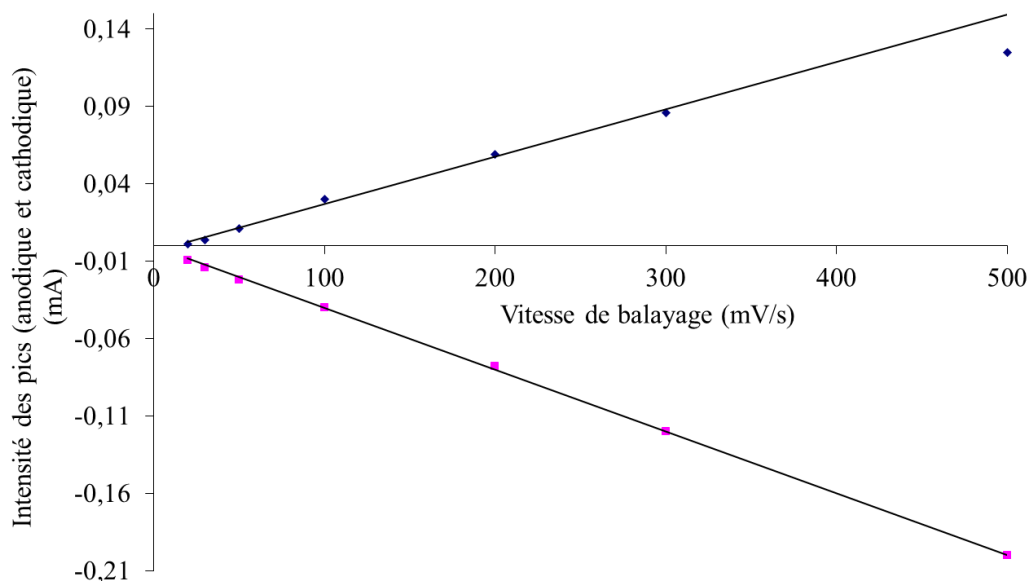


Figure 152. Intensité (mA) des pics anodique et cathodique de la vague électrochimique correspondant au couple Co(II)/Co(I) des voltammogramme cycliques en fonction de la vitesse de balayage (mV).

Comme on l'a expliqué précédemment cette variation linéaire est caractéristique d'une espèce greffée sur l'électrode. On confirme ainsi que les hybrides interagissent fortement avec les nanotubes de carbone fixés sur l'électrode de carbone vitreux. Comme dans le cas de l'holo-myoglobine précédemment, le complexe $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$ déposé sur nanotubes de carbone n'a pas donné de signal électrochimique. Nous pouvons donc raisonnablement élargir ces résultats aux hybrides Mb- $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et Mb- $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$.

Comme pour l'étude de l'hybride Mb- $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ nous observons une vague électrochimique correspondant au couple Co(II)/Co(I) ce qui nous permet de comparer son potentiel au potentiel de ce même couple hors de la protéine. Nous avons étudié pour cela le complexe $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$ par voltamétrie cyclique en solution à 2 mM dans du tampon Tris/HCl 100 mM + NaCl 100 mM pH 7.5 avec une électrode de travail en carbone vitreux avec (en rouge figure 153) et sans (en bleu figure 153) dépôt de nanotubes de carbone.

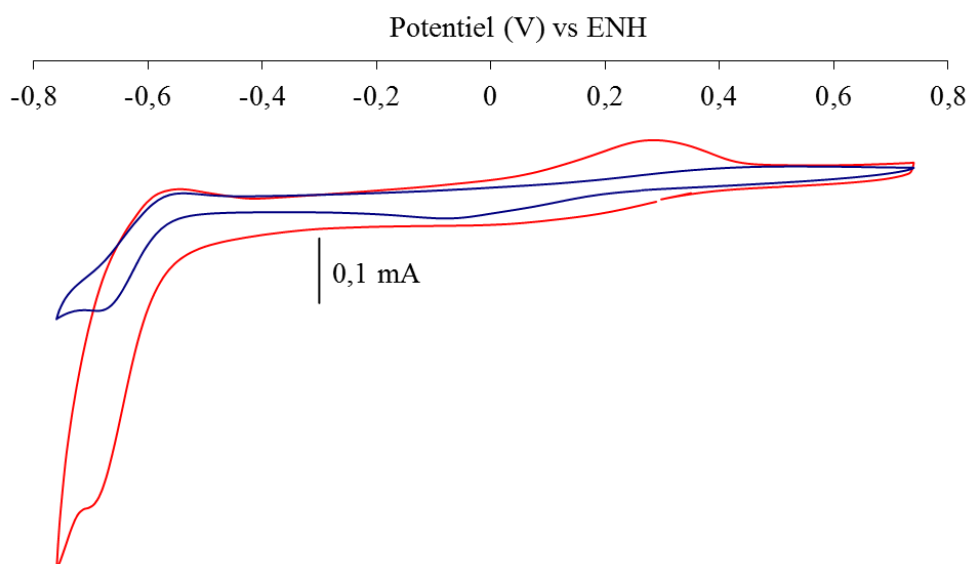


Figure 153. Voltammogrammes cycliques du complexe $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$ à 2 mM dans du tampon Tris/HCl 100 mM + NaCl 100 mM pH 7.5 mesurés avec une électrode de travail ECV (bleu) ou ECV/CNT (rouge).

Comme cela a été le cas lors de l'étude du complexe $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, les nanotubes de carbone ont une influence marquée sur la vague électrochimique correspondant au couple $\text{Co(III)}/\text{Co(II)}$. La vague électrochimique correspondant au couple $\text{Co(II)}/\text{Co(I)}$ a alors un potentiel de -0.62 V par rapport à l'électrode normale à hydrogène. Dans le cas de l'électrode à base de nanotubes de carbone, cette vague semble également couplée à la vague électrochimique correspondant au couple H^+/H_2 , pour des potentiels plus négatifs que -0.7 V vs ENH.

On observe donc un décalage de 0.3 V vers les potentiels positifs lorsque le complexe de cobalt est dans l'enveloppe protéique (tableau 9). Ce décalage est donc dans le sens opposé à celui observé dans le cas de la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ ce qui montre que l'environnement protéique a une influence différente suivant la nature du complexe. En effet les différents complexes de cobalt, et particulièrement les cobaloximes comparées au complexe diimine dioxime de cobalt, n'ont pas la même orientation à l'intérieur de la protéine et donc n'ont pas le même environnement (comme on l'a confirmé dans le chapitre III).

Espèce électroactive	$[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$	Mb- $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$
Potentiel électrochimique (vs ENH)	- 0,62 V	- 0,43 V

Tableau 9. Potentiels électrochimiques par rapport à l'électrode normale à hydrogène de CoBF_2 dans différents environnements.

1.6. Electrodes gélifiées

Comme nous venons de le voir, nous sommes capables d'immobiliser les hybrides à partir de myoglobine sur une électrode de carbone vitreux par interaction avec des nanotubes de carbone. Ces électrodes modifiées sont suffisamment stables pour que l'on puisse mesurer le potentiel électrochimique du couple Co(II)/Co(I) pour les 3 complexes incorporés dans la myoglobine. Cependant leur stabilité reste limitée et ne nous permet pas, par exemple, de coupler le système à une chromatographie gazeuse afin d'étudier l'activité catalytique des hybrides. Nous avons donc tenté de modifier la méthode d'immobilisation des hybrides afin d'essayer d'améliorer leur stabilité. Pour cela nous avons immobilisé les hybrides dans un gel conducteur. Nous avons travaillé avec un gel d'agarose utilisé pour les électrophorèses d'ADN (mélange d'agar-agar pour le gel et de Tris/Acétate/EDTA pour la conductivité) auquel nous avons ajouté des nanotubes de carbone pour améliorer la conductivité. Une fois le mélange préparé, l'hybride y est incorporé rapidement et une goutte de ce gel est déposée sur l'électrode de carbone vitreux. Afin de faire adhérer le gel à l'électrode de carbone vitreux il a été nécessaire d'y faire un dépôt préalable de nanotubes de carbone.

La mise au point de l'électrode (ECV/CNT/gel) ainsi modifiée a été faite avec de l'holo-myoglobine. Comme le montre le voltammogramme figure 154 nous observons une vague électrochimique correspondant au couple Fe(III)/Fe(II) de l'hème à un potentiel de demi-vague de -0.14V par rapport à l'électrode normale à hydrogène. Cette valeur est du même ordre de grandeur que la valeur du potentiel de demi-vague de -0.17V mesurée avec les électrodes modifiées GDL/CNT/holoMb/Naf et ECV/CNT/holoMb

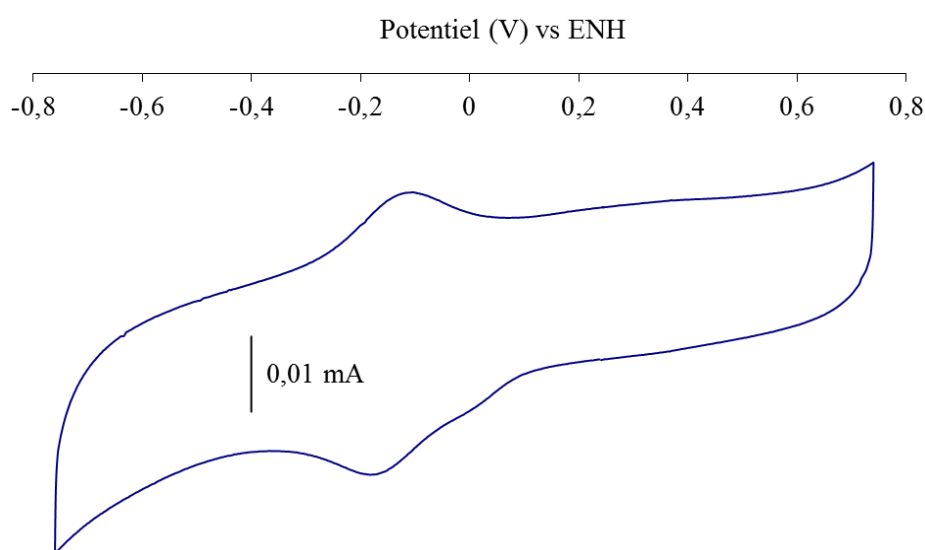


Figure 154. Voltammogramme cyclique obtenu dans du tampon Tris/HCl 100 mM + NaCl 100 mM pH 7.5 avec une électrode de travail ECV/CNT/gel/holoMb.

Nous pouvons voir que le dépôt de gel d'holo-myoglobine est stable sur l'électrode comme cela était le cas pour l'électrode ECV/CNT/holoMb. La plus faible intensité des vagues électrochimiques observée dans le cas de l'électrode ECV/CNT/gel/holoMb peut s'expliquer par la dilution de l'échantillon du fait de son incorporation dans le gel. Nous avons donc appliqué le même protocole afin d'étudier par voltammétrie cyclique l'hybride Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂]. Le voltammogramme cyclique, représenté figure 155, ne montre pas une amélioration de la stabilité de l'hybride sur l'électrode puisque l'on peut voir une forte diminution de l'intensité du pic cathodique dès le deuxième cycle.

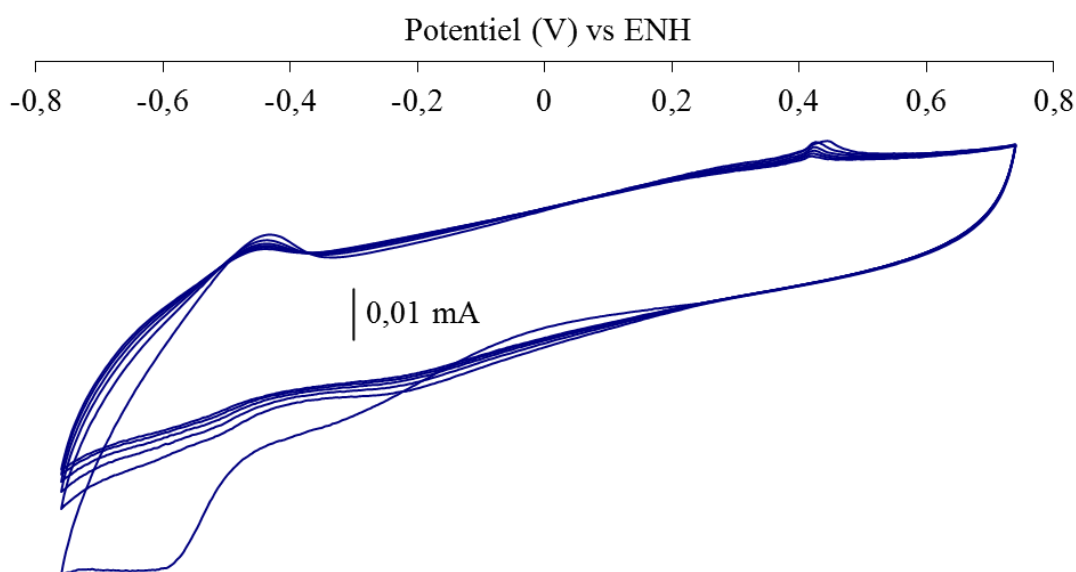


Figure 155. Voltammogramme cyclique obtenu dans du tampon Tris/HCl 100 mM + NaCl 100 mM pH 7.5 avec une électrode de travail ECV/CNT/gel/MbCoBF₂.

Lors du premier cycle on observe une vague électrochimique au potentiel de -0.52 V vs ENH en bon accord avec la valeur de - 0.48 V vs ENH mesurée avec les électrodes non gélifiées à base de nanotubes de carbone. A partir du deuxième cycle, on observe deux légères vagues irréversibles en oxydation pouvant correspondre aux couples Co(III)/Co(II) et Co(II)/Co(I). Cependant le même phénomène de diminution du signal de la vague cathodique du couple Co(II)/Co(I) a été observé. Cette nouvelle méthodologie ne permettant pas de surmonter le problème de stabilité des électrodes, nous n'avons pas poursuivi avec les autres hybrides.

Grâce à l'étude par voltammétrie cyclique des hybrides, via l'utilisation d'une électrode modifiée permettant le greffage de protéines sur la surface, nous avons réussi à étudier les propriétés électrochimiques de différents complexes de cobalt, [Co(dmgbH)₂(H₂O)₂], [Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] et [Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂], incorporés dans la myoglobine. Cette étude

nous a permis de constater que l'enveloppe protéique a une influence sur le potentiel électrochimique du couple Co(II)/Co(I), qui est mis en jeu dans le mécanisme de catalyse de la réduction de protons par ces complexes de cobalt. Nous allons donc maintenant étudier les propriétés catalytiques en solution de ces hybrides ainsi que celle des hybrides à partir d'hème oxygénase.

2. Etude catalytique

La dernière étape de l'étude des enzymes artificielles que l'on a préparées est l'étude de leur activité catalytique pour la production d'hydrogène.

2.1. Généralités

2.1.1. Méthode d'analyse

Nous avons pu montrer dans le chapitre 3 au travers de la caractérisation des hybrides que ces derniers ont un ratio 1 pour 1 en protéine et complexe lorsque l'on n'a pas recours à la concentration après leur formation. Nous avons également prouvé que leur formation est un processus irréversible. Ces résultats nous ont amené à étudier l'activité catalytique des hybrides en solution diluée avec une formation *in situ* des hybrides. Cette méthode présente également l'avantage d'avoir un accès direct à la concentration en complexe, et donc en hybride, dans la solution sans avoir à réaliser pour chaque échantillon un dosage de cobalt, technique indisponible au laboratoire et mise en place en collaboration. Nous avons utilisé pour nos tests une micro électrode de Clark, représentée figure 156 avec sa chambre de mesure, capable de détecter des concentrations en hydrogène dissous en solution aqueuse de l'ordre du micromolaire. La solubilité de l'hydrogène à température ambiante étant de 800 μM cette méthode est la plus adaptée à notre étude en solution diluée.

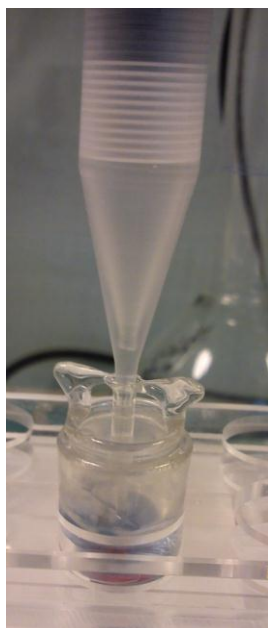


Figure 156. Microélectrode de Clark Unisense avec le flacon de mesure de 1 mL permettant d'assurer l'étanchéité par rapport à l'oxygène.

On mesure par cette méthode en temps direct un courant en picoampère (pA) directement proportionnel à la concentration en hydrogène dissous dans la solution. L'étalonnage de l'appareil s'est révélé nécessaire avant chaque mesure. D'une manière générale différents tampons (tampons Tris/HCl, tampon de phosphate de potassium et tampon Hepes) ont été testés sans observer d'influence particulière. De plus, l'ajout de glycérol ou de différents médiateurs redox n'ont également pas été concluants, perturbant par ailleurs la mesure de la quantité d'hydrogène dissous dans le cas du glycérol.

2.1.2. Thermodynamique et cinétique

Comme nous l'avons vu au cours du chapitre I la production d'hydrogène catalysée par les complexes de cobalt nécessite à la fois la réduction du catalyseur et sa protonation. L'étude catalytique se faisant en milieux aqueux les protons viennent directement de l'eau. En ce qui concerne les électrons nous avons deux possibilités : les apporter via l'utilisation d'un réducteur chimique ou par l'intermédiaire d'un photosensibilisateur, par photoexcitation.

Afin que la réduction du Co(II) en Co(I) soit thermodynamiquement favorable il faut que le potentiel électrochimique du réducteur soit plus négatif que celui du couple Co(II)/Co(I). Suivant la cinétique de la réaction d'oxydoréduction, pour que la réaction se déroule à une vitesse appréciable, il peut en outre être nécessaire que le potentiel redox du réducteur soit très nettement inférieur au potentiel redox du couple Co(II)/Co(I). Cette différence de potentiel, appelée surtension, dépend des espèces électroactives et peut être déterminée par des études

électrochimiques à l'équilibre (études polarographiques ou sur électrode tournante). Si un courant significatif est obtenu pour une très faible surtension cela signifie que l'espèce a une cinétique rapide (courbe rouge sur la figure 157). Si, au contraire, il est nécessaire d'appliquer une grande surtension pour observer un courant non nul, l'espèce électroactive a une cinétique de transfert lente (courbe bleue sur la figure 157).

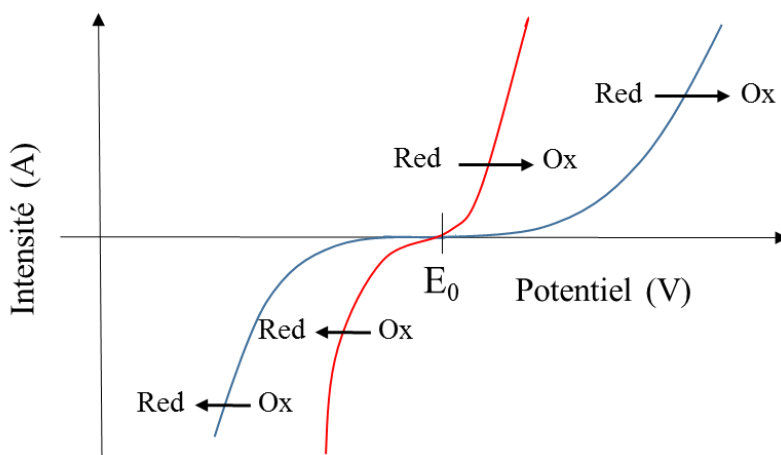


Figure 157. Intensité en fonction du potentiel correspondant à une réaction d'oxydoréduction rapide (courbe rouge) et lente (courbe bleue). E_0 : potentiel redox du couple Red/Ox.

C'est pour cette raison que nous avons choisi dans les deux cas (réducteur chimique ou photosensibilisateur) un système avec un potentiel électrochimique très négatif (autour de -1.1V vs NHE) et un système avec un potentiel moins négatif (autour de $-0.8/-0.6\text{ V}$ vs NHE) permettant, si la cinétique est favorable, de travailler en conditions plus douces.

2.1.3. Les réducteurs chimiques

Nous avons choisi de travailler avec deux complexes d'euprium (II) comme réducteurs chimiques : $[\text{Eu}(\text{DTPA})(\text{H}_2\text{O})]^{3-}$ et $[\text{Eu}(\text{EGTA})(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ que l'on nommera par la suite Eu-DTPA et Eu-EGTA. Les structures des ligands sont représentées ci-dessous.²⁰⁴

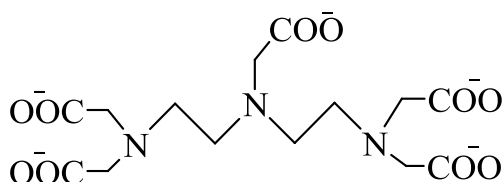


Figure 158. Structure du ligand DTPA : diéthylentriamine-N,N,N',N'',N'''-pentaacetate pentaanionique.

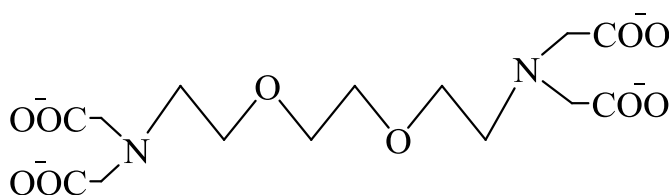


Figure 159. Structure du ligand EGTA : ethylene glycol-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetate tetraanionique.

Les ligands autour du complexe d'Europium influencent son potentiel électrochimique comme l'a montré Fraser Armstrong et ses collaborateurs.²⁰⁵ Ainsi, par rapport à l'électrode normale à hydrogène en tampon aqueux à pH 8, le complexe Eu-DTPA a un potentiel de -1.14V alors que le complexe Eu-EGTA a un potentiel de -0.88V.

2.1.4. Les couples photosensibilisateur/donneur d'électrons sacrificiel

Nous avons également décidé d'apporter les électrons à notre système à partir de donneurs d'électrons sacrificiels via un photosensibilisateur. Cette méthode présente l'avantage de créer *in situ* les équivalents réducteurs et donc d'éviter une concentration trop importante en pouvoir réducteur pouvant réagir également avec d'autres espèces présentes (comme par exemple certains acides aminés de l'enveloppe protéique) ou forcer certaines réactions de dégradation, notamment au niveau des ligands du complexe. Nous avons choisi deux couples avec des potentiels à peu près similaires aux deux réducteurs chimiques décrits plus haut. Le potentiel réducteur est fixé par le photosensibilisateur après photoexcitation. Ce dernier est présent en quantité catalytique puisqu'il sert, en quelque sorte, uniquement de relais d'électrons entre un donneur d'électrons sacrificiel avec lequel il est compatible et le complexe de cobalt. Le premier photosensibilisateur que nous avons choisi est un complexe de ruthénium particulièrement utilisé pour les études de photoproduction d'hydrogène en milieu organique ou mixte organique/eau : $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]\text{Cl}_2$. L'excitation du ruthénium (l'état excité du complexe est noté Ru^*) a une influence sur le potentiel électrochimique des couples $\text{Ru}(\text{III})/\text{Ru}(\text{II})$ et $\text{Ru}(\text{II})/\text{Ru}(\text{I})$. Le potentiel du couple $\text{Ru}(\text{III})/\text{Ru}(\text{II})$ passe de + 1.46 V à l'état fondamental à - 0.66 V à l'état excité. Le ruthénium II à l'état excité est donc un meilleur réducteur que le ruthénium II à l'état fondamental (figure 160). Mais dans le même temps, le potentiel du couple $\text{Ru}(\text{II})/\text{Ru}(\text{I})$ passe de - 1.12 V à l'état fondamental à + 1 V à l'état excité, ce qui fait du $\text{Ru}(\text{II})$ à l'état excité également un bon oxydant.

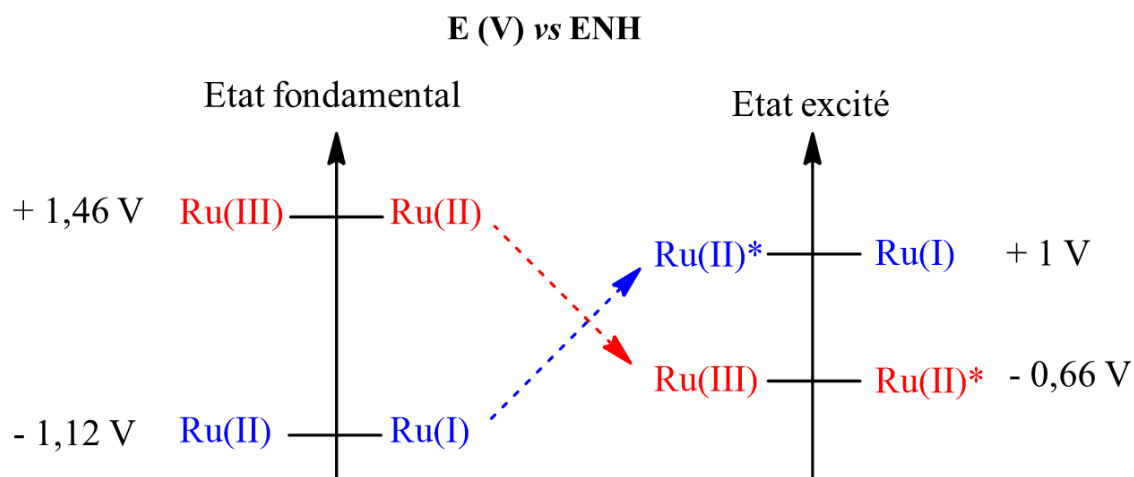


Figure 160. Potentiels électrochimiques par rapport à l'électrode normale à hydrogène des différents couples redox du ruthénium à l'état fondamental et à l'état excité.

Ainsi en présence d'un excès d'ascorbate le ruthénium (II) à l'état excité est réduit en Ru(I) qui est alors assez réducteur pour réduire le complexe de cobalt. En fin de réaction le ruthénium est à l'état d'oxydation II et peut être à nouveau excité par irradiation (figure 161).

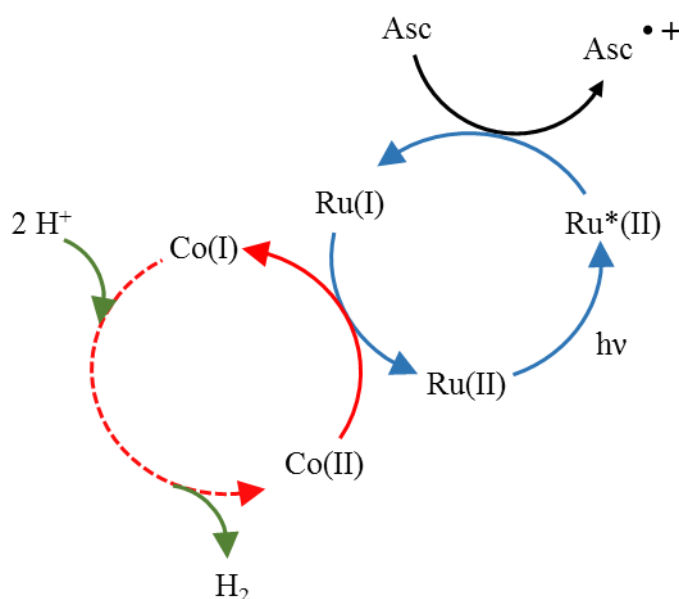


Figure 161. Représentation schématique de la réactivité des complexes de cobalt en photoréduction pour la production d'hydrogène. La flèche en pointillé représente les différents mécanismes impliqués dans la catalyse de production d'hydrogène par les complexes de cobalt (décrit dans le chapitre I).

Le deuxième photosensibilisateur que nous avons choisi d'utiliser est la déazaflavine (DAF). Il s'agit d'un photosensibilisateur souvent utilisé pour les réactions de photoréduction en biologie. La famille des déazaflavines est une famille de dérivés de flavine (structure représentée à gauche figure 162) avec, comme son nom l'indique, un atome de carbone

remplaçant un de ses deux atomes d'azote du cycle médian. La structure de la 5-déazaflavine que nous avons utilisée (appelée par la suite déazaflavine ou DAF) est représentée à droite figure 162.

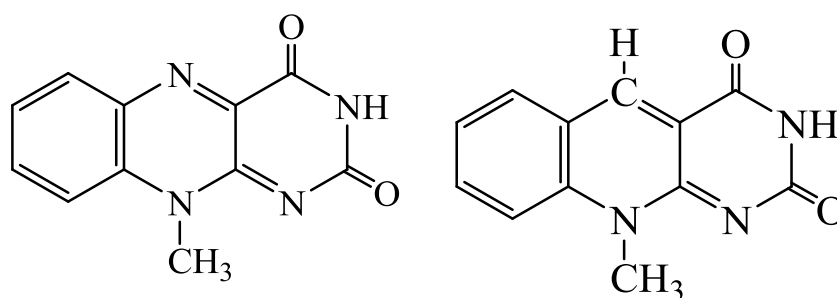


Figure 162. A gauche : structure du cycle de base des flavines. A droite : structure de la 5-déazaflavine utilisée pendant cette étude.

Au cours du processus photocatalytique, se déroulant en absence d'oxygène et en présence de dérivés aminés comme donneur d'électrons sacrificiels, il y a formation, par transfert d'un électron et d'un proton sur la DAF, d'un radical noté DAFH°. Le radical est situé sur le carbone remplaçant l'azote de la flavine. La structure du radical ainsi formé est représentée figure 163. Le radical et l'hydrogène étant sur le carbone remplaçant l'azote de la flavine).

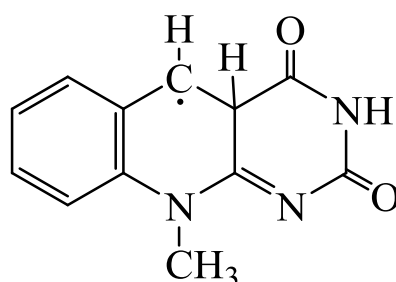


Figure 163. Structure du radical DAFH°.

Le couple DAF/DAFH° a un potentiel électrochimique de $-0.65 \text{ V}^{206,207}$ par rapport à l'électrode normale à hydrogène à pH 7. Ce radical est en équilibre avec la forme dimérique stable. Sous irradiation cet équilibre est déplacé par la photodissociation de ce dimère et l'espèce radicalaire peut alors réduire le complexe de cobalt (figure 164).^{206,208,209}

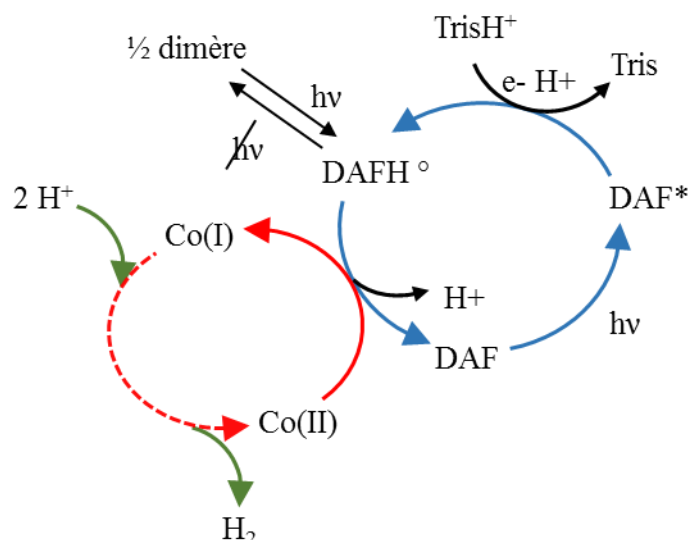


Figure 164. Mécanisme d'action simplifié de la déazaflavine en absence d'oxygène, sous irradiation et en présence d'un composé aminé comme donneur d'électrons sacrificiel.

Nous avons donc été amenés à étudier l'activité catalytique à la fois des hybrides présentés plus haut mais également des complexes seuls dans différentes conditions expérimentales, l'activité catalytique de ces derniers ayant été très peu étudiée en condition complètement aqueuse. Dans la suite de ce chapitre nous nous intéresserons dans un premier temps aux résultats obtenus séparément pour chaque hybride puis nous les comparerons entre eux.

2.2. Résultats

Tout au long de ces études nous avons pu constater que l'activité catalytique des hybrides est dépendante de nombreux paramètres comme par exemple de la nature du complexe et de l'enveloppe protéique mais également de la nature de l'agent réducteur. Toutes les conditions n'ont pas pu être testées par manque de temps et seuls les résultats les plus intéressants seront décrits par la suite. Un tableau récapitulatif de tous les résultats obtenus est présent dans l'annexe 1. D'une manière générale la solution de complexe ou d'hybride est préparée préalablement en absence d'oxygène dans le flacon étanche spécifique à la microélectrode de Clark. Le réducteur ou le photosensibilisateur est ajouté avec une seringue Hamilton lors du lancement de la mesure. Pour des concentrations en cobalt de $91 \mu\text{M}$ et $71 \mu\text{M}$ (testées avec les deux complexes d'euprimum) nous observons lors de l'ajout une coloration bleue dans la solution qui disparaît lentement. Cette couleur bleue est caractéristique des complexes de cobalt à l'état Co(I) et ceci nous indique qu'on arrive bien à réduire les complexes de Co(II) en complexes de Co(I) , une étape nécessaire à la catalyse de production d'hydrogène par ces

derniers. Un spectre UV de la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ en milieu réducteur est présenté figure 165. La bande à 610 nm est caractéristique de l'espèce Co(I) , hydrure de Co(III) .

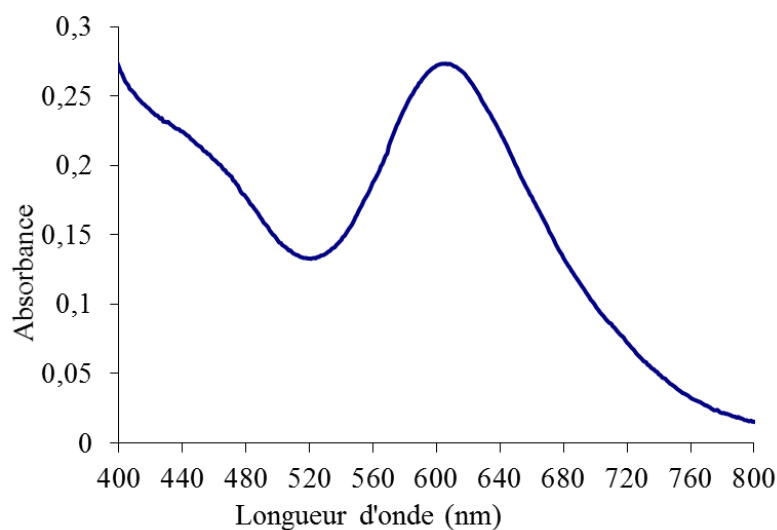


Figure 165. Spectre d'une solution de $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ réduite en présence de 0.1 mM citrate 0.45 M et TiCl_3 2.6 mM à pH 7.5.¹⁰⁸

L'activité catalytique des systèmes est mesurée par le nombre de cycles catalytiques (TON pour Turn Over Number) obtenus une fois la concentration en hydrogène stabilisée. Le nombre de cycles catalytiques est mesuré par rapport à la concentration en cobalt dans la solution ($\text{TON} = [\text{H}_2]_{\text{finale}} / [\text{Co}]$).

2.2.1. Réduction chimique

2.2.1.1. Réducteur Eu-DTPA à pH 7

Le complexe Eu-DTPA, avec un potentiel à pH 8 de -1.14V par rapport à l'électrode normale à hydrogène, est l'agent le plus réducteur parmi ceux que nous avons sélectionnés. Il nous permet donc d'étudier l'activité catalytique des complexes et des hybrides dans les conditions les plus réductrices. Nous avons utilisé ce réducteur ainsi que les deux cobaloximes $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ afin de mettre au point les conditions de catalyse. Dans un premier temps nous avons donc étudié la production d'hydrogène sans agitation dans la cuve ce qui d'un côté permet d'éviter au maximum le passage de l'hydrogène gazeux formé lors de la réaction dans la phase gazeuse au-dessus de la solution. Cependant, d'un autre côté, cela limite la cinétique de l'activité catalytique parce que le réducteur doit diffuser dans la solution. On mesure alors une production lente d'hydrogène pour les deux complexes avec un maximum de la concentration en hydrogène atteinte après environ 80 min pour

[Co(dmgh)₂(H₂O)₂] avec 2.8 cycles catalytiques (en bleu figure 166) et 50 min pour [Co(dmghBF₂)₂(H₂O)₂] avec 1.8 cycles catalytiques (en orange figure 166).

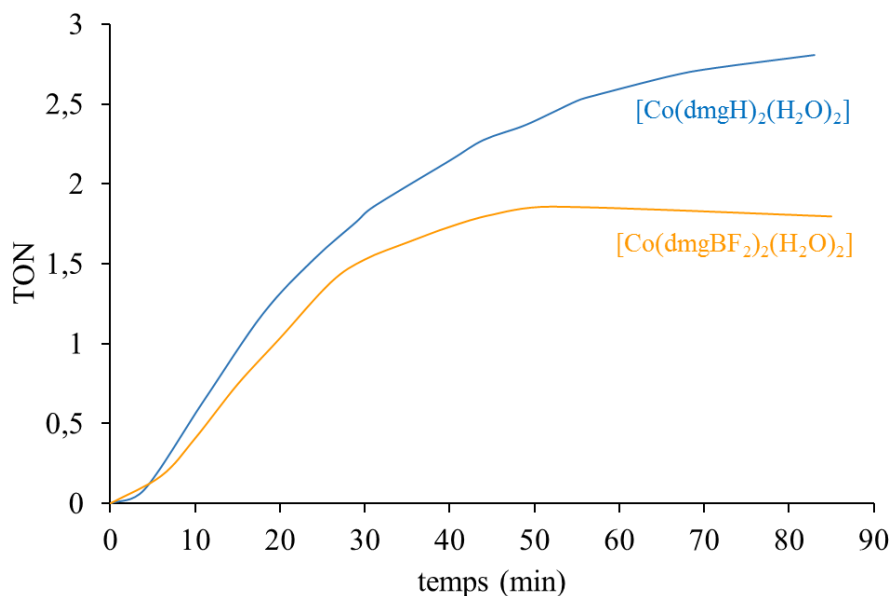


Figure 166. Cycles catalytiques en hydrogène (TON) en fonction du temps (min) pour [Co(dmgh)₂(H₂O)₂] (bleu) et [Co(dmghBF₂)₂(H₂O)₂] (orange) avec ajout d'Eu-DTPA (10 équivalents) en tampon Tris/HCl 50 mM à pH 7.

La réaction est encore plus lente avec les hybrides puisque, par exemple, le maximum, correspondant à un cycle catalytique, est atteint en 90 min avec l'hybride Mb-[Co(dmghBF₂)₂(H₂O)₂] comme catalyseur. Aucune trace d'hydrogène n'a été mesurée en présence d'uniquement un sel de cobalt(II) (chlorure de cobalt hexahydrate) ce qui nous permet de confirmer que, dans ces conditions, les cobaloximes sont bien à l'origine de la catalyse de production d'hydrogène.

Nous avons également mesuré l'activité catalytique des deux cobaloximes avec une agitation douce permettant à la fois d'homogénéiser la solution après ajout du réducteur et d'éliminer les bulles se formant inévitablement lors de la réaction. Nous avons dans un premier temps vérifié que dans ces conditions la mesure de la concentration d'une solution d'hydrogène saturée à 40% (correspondant à une concentration en hydrogène dissous de 320 μM) est stable pendant au moins 30 min ce qui nous permet de valider notre méthode de travail ainsi que de connaître les limites en concentration et en temps à ne pas dépasser pour obtenir des résultats cohérents. En agitant la solution tout au long de la mesure, la cinétique est très significativement accélérée puisqu'on atteint alors le maximum de la concentration en hydrogène en 5 min pour [Co(dmgh)₂(H₂O)₂] avec 2.2 cycles catalytiques, en environ 1 min pour [Co(dmghBF₂)₂(H₂O)₂] avec 2 cycles catalytiques et en quelques secondes pour [Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] avec 1.1 cycles catalytiques comme on peut le voir sur les graphiques figure 167. La quantité

d'hydrogène formée (TON) n'est quand-à-elle pas affectée de manière importante par l'agitation.

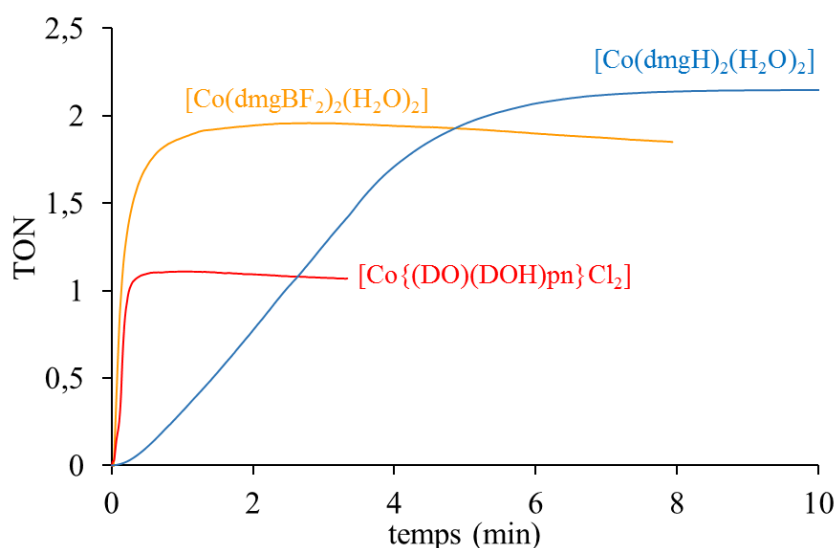


Figure 167. Cycles catalytiques en hydrogène (TON) en fonction du temps (min) pour $[\text{Co}(\text{dmgh})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (bleu) et $[\text{Co}(\text{dmgbF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (orange) et $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$ (rouge) avec ajout d'Eu-DTPA (10 équivalents) en tampon Tris/HCl 50 mM à pH 7.

Les différences observées entre les profils des courbes de concentration d'hydrogène en fonction du temps obtenues pour les différents complexes s'expliquent par des différences cinétiques pouvant être liées à des différences mécanistiques mais nous n'avons pas poussé plus loin cette étude. Nous nous sommes donc intéressés uniquement à l'activité catalytique globale du système (nombre maximum de cycles catalytiques effectués). Comme on peut le voir sur la figure 167 $[\text{Co}(\text{dmgh})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ réalise 2.2 cycles catalytiques, $[\text{Co}(\text{dmgbF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ en réalise 1.8 et $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$ n'effectue qu' 1.1 cycles. Ces résultats prouvent qu'il y a bien formation d'hydrogène en milieux aqueux à pH 7 en présence de ces complexes de cobalt. La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus pour les hybrides nous permettent de plus d'étudier spécifiquement l'influence de l'enveloppe protéique sur l'activité catalytique des complexes. Nous avons ainsi pu mesurer l'activité de production d'hydrogène des deux cobaloximes en présence de myoglobine ou d'hème oxygénase 1 de rat. Comme on peut le voir sur la figure 168 alors qu'on observe une légère diminution de l'activité catalytique de la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgh})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ en présence de myoglobine (1.2 cycles catalytiques), l'activité est légèrement améliorée en présence d'hème oxygénase puisqu'on obtient alors 3 cycles catalytiques.

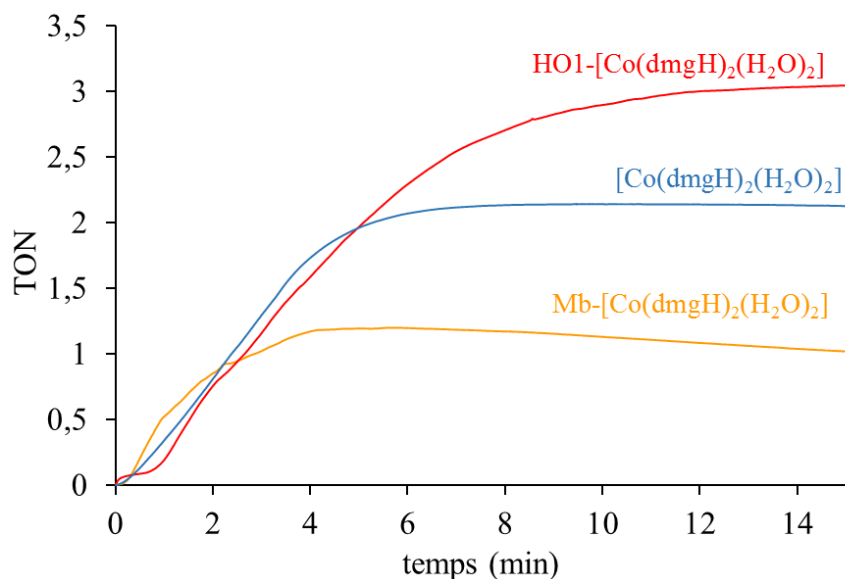


Figure 168. Cycles catalytique en hydrogène (TON) en fonction du temps (min) pour $[\text{Co}(\text{dmgh})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (bleu), Mb- $[\text{Co}(\text{dmgh})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (orange) et HO1- $[\text{Co}(\text{dmgh})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (rouge) avec ajout d'Eu-DTPA (10 équivalents) en tampon Tris/HCl 50 mM à pH 7.

Pour le cas de la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ on obtient environ 0.8 cycle catalytique que ce soit en présence de myoglobine ou en présence d'hème oxygénase ce qui est juste légèrement inférieur au cycle catalytique fait par la cobaloxime seule en solution.

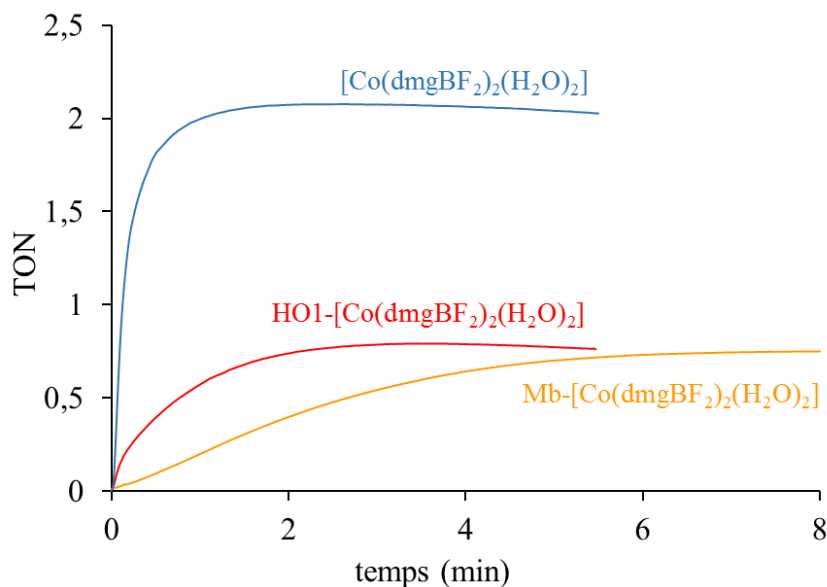


Figure 169. Cycles catalytique en hydrogène (TON) en fonction du temps (min) pour $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (bleu), Mb- $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (orange) et HO1- $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (rouge) avec ajout d'Eu-DTPA (10 équivalents) en tampon Tris/HCl 50 mM à pH 7.

L'hybride Mb- $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$ a donné des résultats similaires (0.7 cycles catalytiques) à l'hybride Mb- $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ dans les mêmes conditions comme le montre la figure 170.

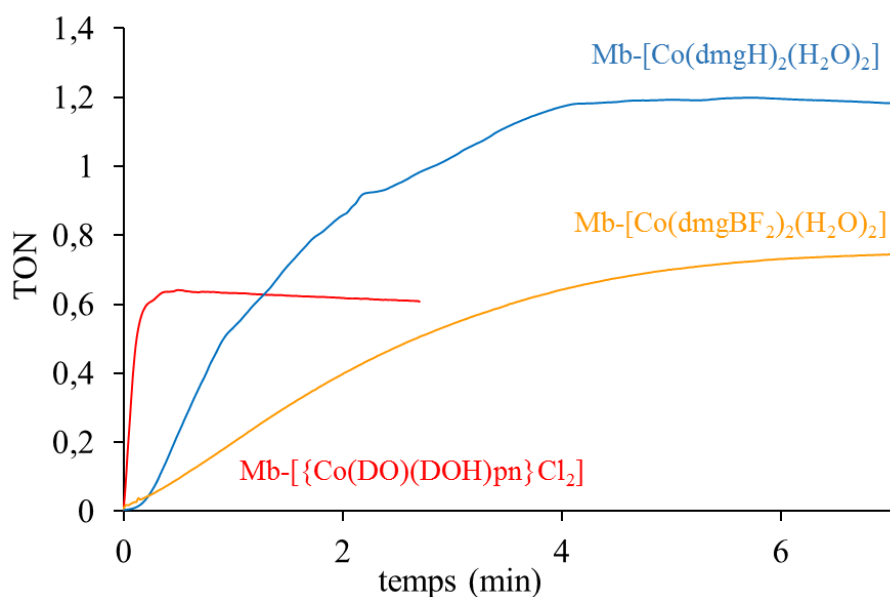


Figure 170. Cycles catalytique en hydrogène (TON) en fonction du temps (min) pour Mb-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂] avec ajout d'Eu-DTPA (10 équivalents) en tampon Tris/HCl 50mM à pH 7.

Ces études préliminaires nous ont permis de confirmer la production d'hydrogène en milieu aqueux à pH 7 que ce soit par les complexes de cobalt seuls ou par les espèces hybrides. Nous avons pu mettre au point un protocole permettant de mesurer le nombre total de cycles catalytiques obtenus. Du fait de la grande sensibilité de la sonde à hydrogène les mesures intéressantes ont été répétées au moins 3 fois et nous avons pu observer des écarts de mesures pouvant aller jusqu'à 38% dans certaines conditions. Cependant il est important de noter que pour les valeurs les plus intéressantes et les plus pertinentes (c'est-à-dire avec une activité catalytique meilleure en présence de protéine ou avec une activité catalytique significative d'une dizaine de cycles) les expériences ont été répétées un nombre de fois suffisant pour obtenir des écarts plus faibles (jusqu'à 20%, incertitude classique du dosage protéique).

Nous avons mesuré l'activité catalytique des trois complexes de cobalt ainsi que celle de certains hybrides à différentes concentrations (91 μ M, 71 μ M et 40 μ M) et nous avons obtenu dans toutes les conditions des résultats similaires. Cela nous prouve qu'avec ce type de réducteur l'activité catalytique est indépendante de la concentration en cobalt.

Une fois la concentration en hydrogène stabilisée nous avons pu relancer la réaction en ajoutant à nouveaux 10 équivalents de complexe d'euprimum comme on peut le voir sur la figure 171 dans le cas du complexe [Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂].

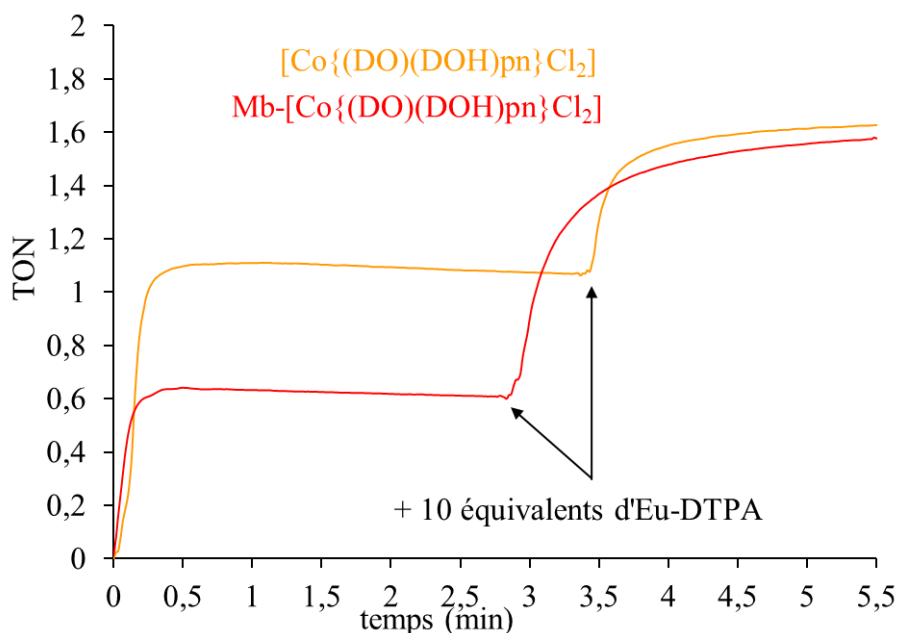


Figure 171. Cycles catalytique en hydrogène (TON) en fonction du temps (min) pour $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$ et $\text{Mb}-[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$ avec ajout de 10 équivalents d'Eu-DTPA à 0 min puis à 3.4 min et 2.8 min respectivement en tampon Tris/HCl 50mM à pH 7.

Cela montre que dans nos conditions d'étude, à la fois pour les complexes seuls en solution et pour les hybrides, la réaction cesse à cause de la dégradation du réducteur (peut-être du fait d'une instabilité en milieux aqueux). Ainsi, l'ajout initial d'une quantité double d'euprium ne nous a pas permis d'augmenter la quantité finale d'hydrogène produit comme on peut le voir sur la figure 172 dans le cas de $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$.

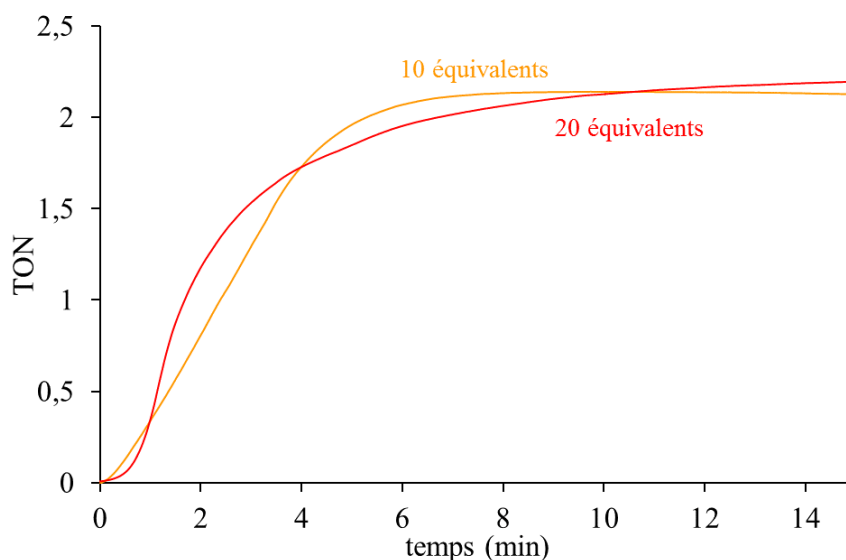


Figure 172. Cycles catalytique de production d'hydrogène en fonction du temps (min) pour $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ avec ajout de 10 équivalents d'Eu-DTPA (jaune) et de 20 équivalents (rouge) en tampon Tris/HCl 50mM à pH 7.

Le complexe $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$, ayant montré l'activité catalytique la plus faible en solution, n'a pas été étudié par la suite dans les autres conditions, l'idée étant de tester son activité catalytique une fois les conditions expérimentales optimales trouvées pour les différents hybrides. Nous présenterons donc dans la suite les résultats obtenus pour les deux cobaloximes ainsi que pour certains hybrides de ces complexes avec des protéines.

2.2.1.2. Réducteur Eu-EGTA à pH 7

Le ligand EGTA permet d'obtenir un complexe d'euprium avec un potentiel réducteur moins négatif comme nous l'avons vu précédemment. Comme nous avons constaté que l'arrêt de la catalyse avec les complexes d'euprium comme réducteur est probablement dû à sa dégradation en solution nous avons par la suite ajouté le réducteur doucement manuellement par seringue Hamilton au cours de la catalyse. Cette méthode nous a permis d'obtenir la quantité maximale d'hydrogène à partir de la quantité de cobalt présent dans l'échantillon puisqu'un ajout supplémentaire d'euprium une fois la concentration d'hydrogène stabilisée ne permet plus d'observer d'activité catalytique. Dans ces conditions les deux cobaloximes ont montré une activité catalytique d'environ 2.5 cycles catalytiques (+/- 8%) pour $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et d'environ 1.8 cycles catalytiques (+/- 14%) pour $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (figure 173).

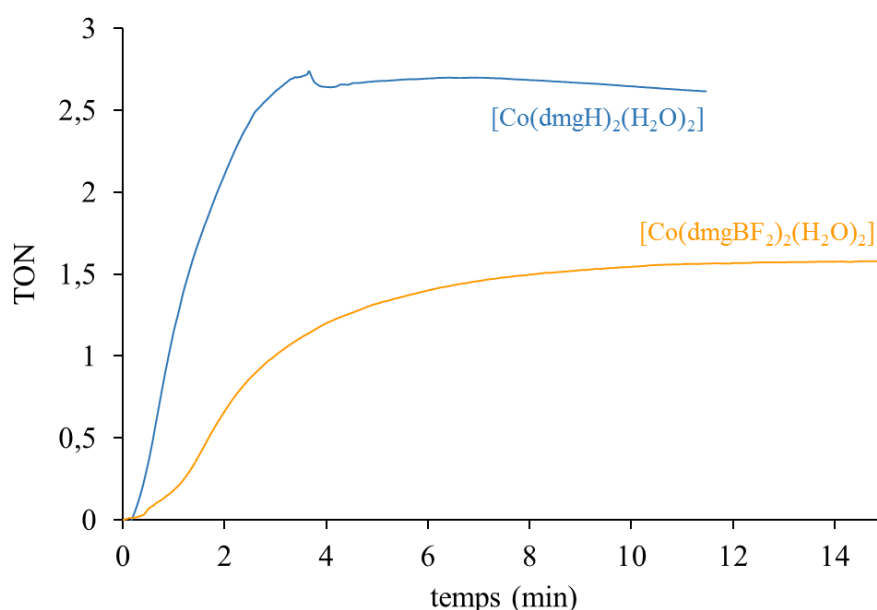


Figure 173. Cycles catalytiques en hydrogène (TON) en fonction du temps (min) pour $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (bleu) et $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (orange) avec ajout d'Eu-DTPA (10 équivalents) en tampon Tris/HCl 50 mM à pH 7.

Pour la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, l'influence de la myoglobine sur l'activité catalytique est très importante puisque l'hybride Mb- $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ ne catalyse

quasiment pas la production d'hydrogène en présence du réducteur Eu-EGTA (on a pu mesurer au maximum jusqu'à 0.3 cycle catalytique).

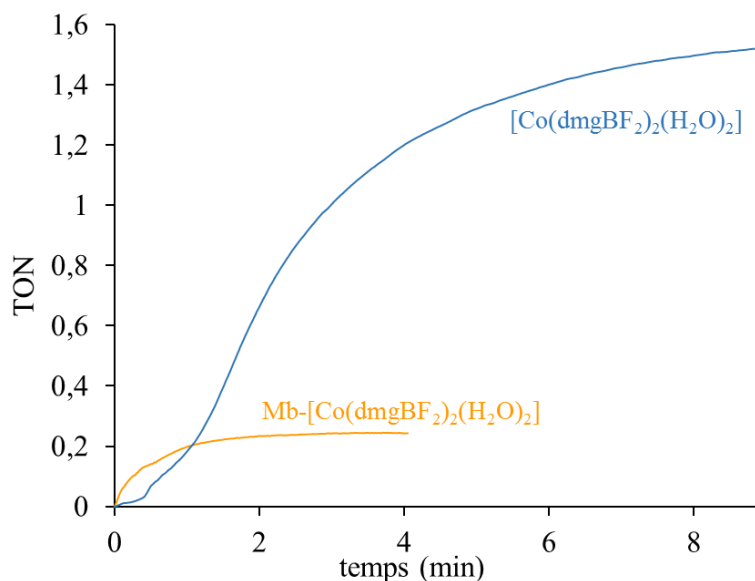


Figure 174. Cycles catalytiques en hydrogène (TON) en fonction du temps (min) pour [Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] (bleu) en tampon Tris/HCl 50mM à pH 7, Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] (orange) avec ajout d'Eu-EGTA (10 équivalents) en tampon phosphate de potassium 20 mM/KCl 100 mM.

Les résultats préliminaires obtenus pour l'hybride HO1-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] montrent une activité de l'hybride d'environ 3 cycles catalytiques ce qui est donc légèrement supérieur à l'activité du complexe seul en solution. Ce résultat doit cependant être confirmé par des mesures complémentaires.

Dans le cas du complexe [Co(dmgbH)₂(H₂O)₂] l'enveloppe protéique n'inhibe jamais dans ces conditions son activité catalytique. Ainsi, l'hybride à base de myoglobine a une activité légèrement supérieure à celle du complexe seul en solution (qui est d'environ 2.5 cycles +/- 8%) avec 3.2 cycles catalytique (+/- 6%). Les deux hybrides à partir d'hème oxygénase (HO1 et HmuO) ont quant à eux montré des activités catalytiques nettement supérieures avec 6.2 cycles catalytiques (+/-3%) pour l'hybride HO1-[Co(dmgbH)₂(H₂O)₂] et 5 cycles catalytiques (+/- 16%) pour l'hybride HmuO-[Co(dmgbH)₂(H₂O)₂] comme on peut le voir figure 175. Les pics observés sur les courbes sont dus à la perturbation du signal électrique lors de l'ajout de réducteur.

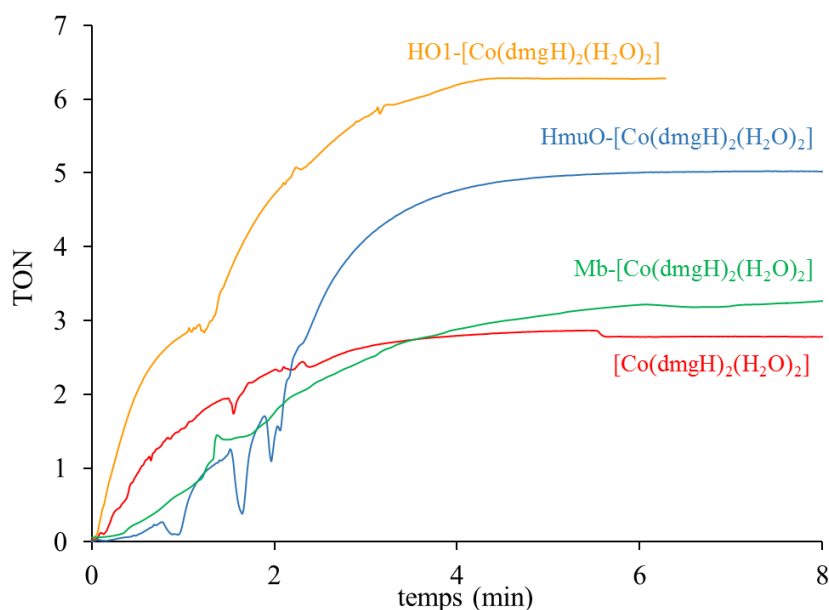


Figure 175. Cycles catalytique en hydrogène (TON) en fonction du temps (min) avec un ajout lent de réducteur Eu-EGTA pour $[\text{Co}(\text{dmgh})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (rouge) en tampon Tris/HCl 50 mM à pH 7, Mb- $[\text{Co}(\text{dmgh})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (vert), HO1- $[\text{Co}(\text{dmgh})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (orange) et HmuO- $[\text{Co}(\text{dmgh})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (bleu) en tampon phosphate de potassium 20 mM/KCl 100 mM.

Les différentes activités catalytiques obtenues avec Eu-DTPA et Eu-EGTA comme réducteur sont rapportées dans le tableau 10.

	Eu EGTA			EuDTPA	
CoH	91μM	71μM	40μM	91μM	71μM
CoH	3		2.3-2.5-2.7 (2.5 +/- 8%)	2.8-2 (2.4 +/- 17%)	
MbCoH		3	2- 3.3-4 (3.2 +/- 6%)		1.2
HO1CoH			6.3-6 (6.2 +/- 3%)		3
HmuOCoh			4.3-4.8-5.8 (5 +/- 16%)		
CoB	91μM	71μM	40μM	91μM	71μM
CoB	1.5-2 (1.75 +/- 14%)	1.5		1.8- 2-2-1-1 (1.5 +/- 33%)	
MbCoB		0.3-0.3-0.2 (0.27 +/- 26%)		1- 0.8	0.8
HO1CoB		3		0.8	
CoD	91μM	71μM	40μM	91μM	71μM
CoD				1.1	1
MbCoD					0.7

Tableau 10. Tableau récapitulatif des différentes valeurs de l'activité catalytique en TON. La valeur moyenne ainsi que l'écart des mesures sont rapportés entre parenthèse. Ajout complet en 1 fois – ajout progressif.

2.2.2. Conditions photocatalytiques

Pour les études photocatalytiques l'espèce réductrice est créée *in situ* par irradiation de la solution. Cela revient donc à faire un ajout progressif du réducteur au cours de la réaction. Afin d'éviter un début de réaction dû à la lumière naturelle, le photosensibilisateur est ajouté simultanément à la mesure d'hydrogène et à l'irradiation par lampe xénon. Nous avons alors pu constater que la réaction de production d'hydrogène avec agitation de la solution est beaucoup plus lente en condition de photoréduction que lors de l'utilisation de réducteurs chimiques. Ainsi, dans le cas par exemple de l'utilisation de la déazaflavine comme photosensibilisateur, la concentration en hydrogène se stabilise au maximum en une vingtaine de minutes. Le phénomène est encore plus marqué lorsqu'on utilise le complexe de ruthénium (II) trisbipyridine comme photosensibilisateur puisqu'il faut attendre environ une heure pour observer une stabilisation de la concentration en hydrogène. Ce phénomène s'explique par le fait que la réaction de réduction est contrôlée par l'excitation du photosensibilisateur et donc limitée par le flux de photons.

Enfin, en conditions photocatalytiques nous n'avons pas observé de coloration bleue de la solution lors de l'ajout du photosensibilisateur ou durant la réaction. Or, comme on le verra ci-après, il y a bien production d'hydrogène. Cette absence de coloration s'explique par le fait que les concentrations en cobalt utilisées dans ces expériences sont inférieures (30 μM et 10 μM) et est à mettre en relation avec la cinétique beaucoup plus lente de la réaction ne permettant pas l'accumulation de l'intermédiaire Co(I).

2.2.2.1. Couple $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]\text{Cl}_2/\text{ascorbate}$ à pH 6

Dans le cas de l'emploi du complexe $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ comme photosensibilisateur et de l'ascorbate comme donneur d'électrons sacrificiel, permettant d'atteindre un potentiel électrochimique de l'ordre du réducteur Eu-EGTA, nous avons décidé de travailler en présence de 10 μM de complexe ou d'hybride en tampon phosphate 50 mM, ascorbate 100 mM à pH 6 avec 20 équivalents (200 μM) de photosensibilisateur. En effet, dans ces conditions, les complexes seuls en solution ont montré une bonne activité catalytique avec 7 cycles catalytiques (+/- 0%) en environ 40 min pour $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et 5.5 cycles catalytiques en environ 60 min pour $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$.

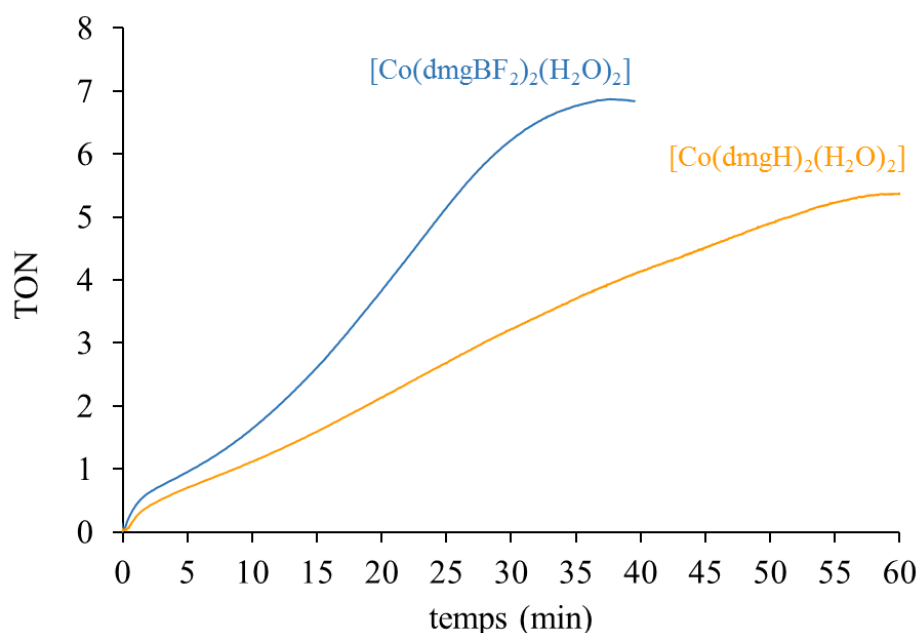


Figure 176. Cycles catalytique en hydrogène (TON) en fonction du temps (min) pour $[\text{Co}(\text{dmgbH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (bleu) et $[\text{Co}(\text{dmgbF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (orange) en présence de ruthénium (20 équivalents) dans du tampon phosphate de potassium 50 mM/ascorbate 100 mM à pH 6 sous irradiation.

Nous avons également testé les hybrides avec la myoglobine comme enveloppe protéique pour les cobaloximes. Que ce soit Mb- $[\text{Co}(\text{dmgbH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ ou Mb- $[\text{Co}(\text{dmgbF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ nous avons obtenu des résultats avec un écart entre les mesures relativement grand puisque de l'ordre de 33%. Il a donc été difficile de sortir une valeur d'activité catalytique pour ces hybrides. Cependant dans tous les cas on a obtenu plus d'un cycle catalytique mais avec des valeurs toujours inférieures à celles mesurées pour les complexes seuls en solution. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 11.

	$[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$
CoH	10 μM
CoH	7-7
MbCoH	1.5-3 (33%)
CoB	10 μM
CoB	5.5-5 (5.25 \pm 5%)
MbCoB	5-2.5 (3.75 \pm 33%)

Tableau 11. Tableau récapitulatif des différentes valeurs de l'activité catalytique en TON. La valeur moyenne ainsi que l'écart des mesures sont rapportés entre parenthèse. Ajout complet en 1 fois.

2.2.2.2. Couple déazaflavine/Tris à pH 7

Nous avons également utilisé la déazaflavine comme photosensibilisateur associée au tampon Tris comme dérivé aminé donneur d'électrons sacrificiel (figure 177).

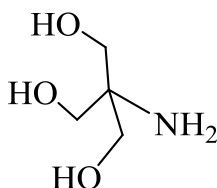


Figure 177. Structure du tampon Tris : 2-Amino-2-(hydroxyméthyl)propane-1,3-diol.

L'espèce DAFH° a un potentiel de -0.65 V par rapport à l'électrode normale à hydrogène à pH 7 donc il s'agit du réducteur le plus doux utilisé jusqu'alors. La déazaflavine étant nécessaire en quantité catalytique seul 0.5 équivalent a été ajouté à la solution simultanément à l'irradiation et à la mesure de la concentration en hydrogène.

Dans le cas de $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et de l'hybride associé Mb- $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ les résultats obtenus sont assez similaires à ceux obtenus avec le réducteur Eu-EGTA (de potentiel -0.88 V par rapport à l'électrode normale à hydrogène). Nous avons donc été amené à travailler à des concentrations en cobalt de 30 μM afin d'avoir des mesures suffisamment significatives. En effet, dans ces conditions, le complexe seul en solution a montré une activité de 2 cycles catalytiques (+/- 20%) et l'activité de l'hybride Mb- $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ n'est pas catalytique avec une production d'environ 0.7 équivalent (+/- 25%) d'hydrogène par rapport au cobalt comme on peut le voir figure 178.

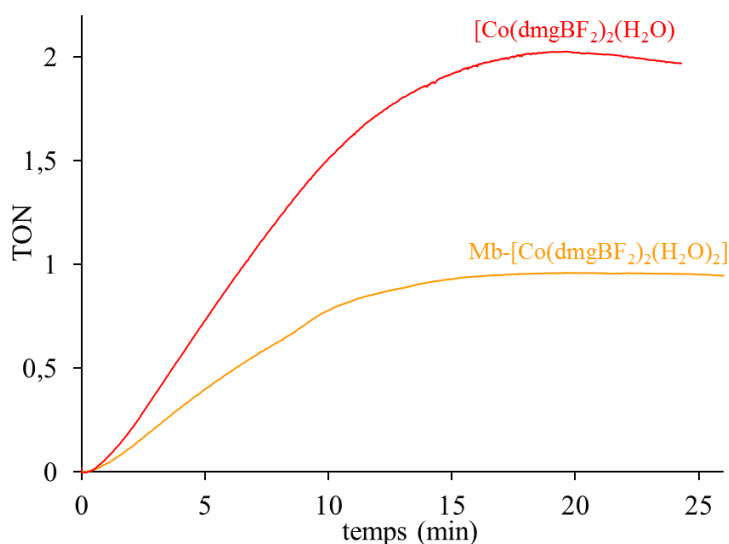


Figure 178. Cycles catalytique en hydrogène (TON) en fonction du temps (min) pour $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (rouge) et Mb- $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (orange) en présence de déazaflavine (0,5 équivalents) dans du tampon Tris 50mM pH 7 + 100 mM NaCl sous irradiation.

Chapitre IV – Etudes électrochimiques et catalytiques

Le complexe $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ a montré quant à lui des activités plus significatives. En effet à une concentration de $30\mu\text{M}$ en cobalt nous avons pu obtenir pour le complexe en solution une activité d'environ 8 cycles catalytiques (+/- 20 %). Dans les mêmes conditions l'hybride $\text{Mb}-[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ a effectué environ 4 cycles catalytiques (+/- 25%) comme on peut le voir figure 179.

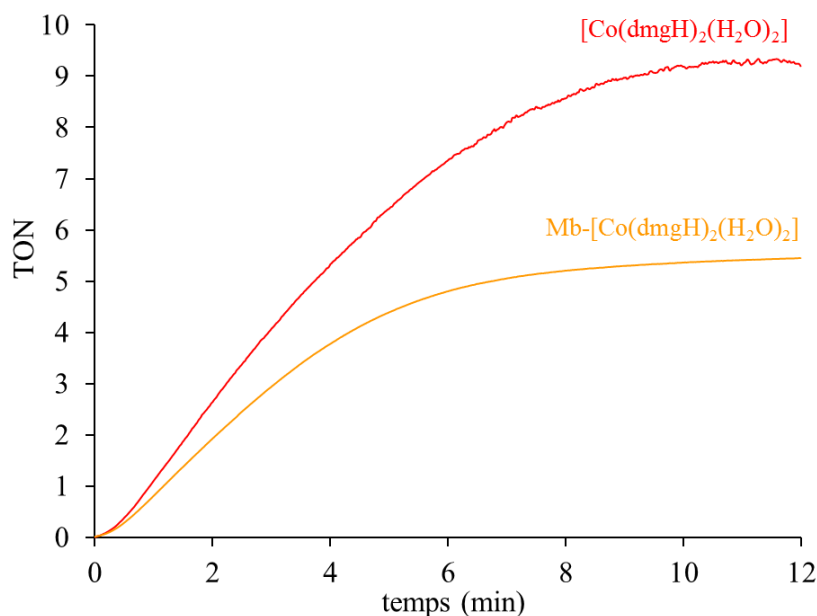


Figure 179. Cycles catalytiques en hydrogène (TON) en fonction du temps (min) pour $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (rouge) et $\text{Mb}-[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (orange) en présence de déazaflavine (0,5 équivalents) dans du tampon Tris 50 mM pH 7 + 100 mM NaCl sous irradiation.

L'activité catalytique du complexe seul en solution étant relativement importante nous avons pu diminuer encore la concentration en cobalt et donc en déazaflavine ce qui a eu pour effet d'améliorer l'activité catalytique du système. Ainsi pour une concentration de $10\mu\text{M}$ en cobalt on a pu obtenir environ 20 cycles catalytiques (+/- 12%) pour le complexe $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ seul en solution. En présence d'hème oxygénase 1 de rat la cobaloxime a montré une activité catalytique de 6.2 cycles (+/- 2%). L'hybride $\text{HmuO}-[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, a quant à lui montré de meilleures activités catalytiques puisque nous avons obtenu 15.3 cycles catalytiques (+/- 11%). Cette valeur reste inférieure à l'activité catalytique du complexe seul mais il s'agit de la meilleure activité catalytique mesurée pour nos hydrogénases artificielles.

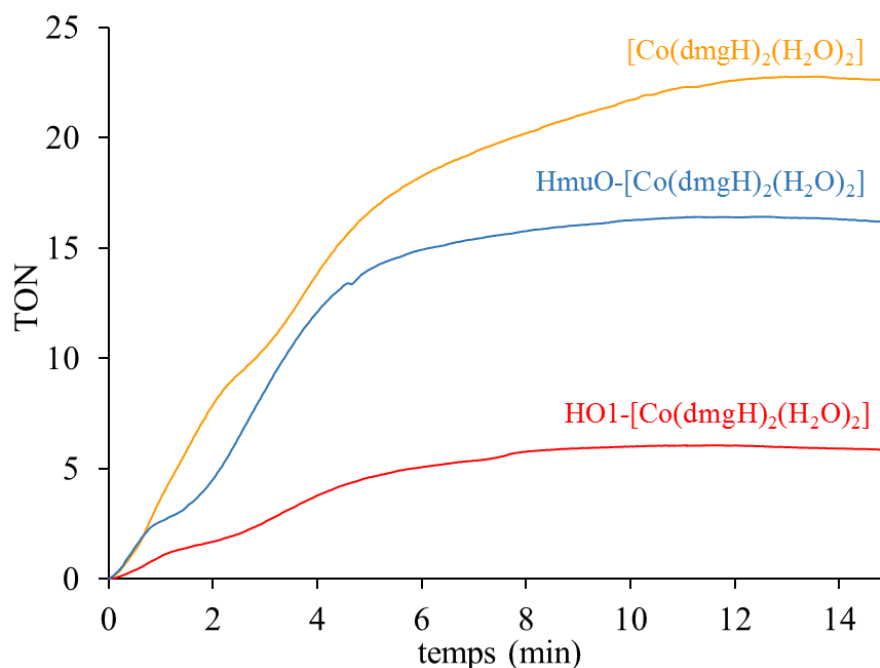


Figure 180. Cycles catalytiques en hydrogène (TON) en fonction du temps (min) pour $[\text{Co}(\text{dmgh})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (orange), $\text{HmuO}-[\text{Co}(\text{dmgh})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (bleu) et $\text{HO1}-[\text{Co}(\text{dmgh})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (rouge) en présence de déazaflavine (0,5 équivalents) dans du tampon Tris 50 mM pH 7 + 100 mM NaCl sous irradiation.

Les différentes activités catalytiques obtenues sont rapportées dans le tableau 12.

	DAF	
CoH	30 μM	10 μM
CoH	8-8-7 (8.3 \pm 20%)	18-23 (20.5 \pm 12%)
MbCoH	3-5 (4 \pm 25%)	
HOCoh		6.3-6 (6.15 \pm 2%)
HmuOCoh		16-14.5 (15.25 \pm 11%)
CoB	30 μM	10 μM
CoB	1.5-2-2.4-2.2 (2 \pm 20%)	
MbCoB	0.5-0.8 (0.65 \pm 25%)	

Tableau 12. Tableau récapitulatif des différentes valeurs de l'activité catalytique en TON. La valeur moyenne ainsi que l'écart des mesures sont rapportés entre parenthèse. Ajout complet en 1 fois – ajout progressif.

3. Discussion

Au cours de ces études nous avons pu prouver que les hybrides préparés à partir d'hémoprotéines sous forme apo et de différents complexes de cobalt, dont la caractérisation a été présentée dans le chapitre 3, catalysent la production d'hydrogène à partir d'eau et sont donc des hydrogénases artificielles.

3.1. Relation entre électrochimie et catalyse

Les résultats obtenus en électrochimie et en catalyse peuvent être corrélés puisque, comme nous l'avons expliqué précédemment, à la fois la thermodynamique et la cinétique d'une réaction d'oxydoréduction sont liées à la différence entre les potentiels électrochimiques des deux espèces mises en jeu (dans notre cas le complexe de cobalt(II) et le réducteur ou le photosensibilisateur photoréduit). Que ce soit pour les complexes de cobalt seuls en solution ou insérés dans une enveloppe protéique, les agents réducteurs utilisés ont un potentiel électrochimique plus négatif que le potentiel électrochimique du couple Co(II)/Co(I) lorsque ce dernier a pu être mesuré.

Nous avons pu observer par électrochimie une influence de la myoglobine sur le potentiel électrochimique du couple Co(II)/Co(I). En effet, alors que nous avons pu mesurer un potentiel de -0.48 V (*vs* ENH) pour l'hybride Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] et de -0.62 V (*vs* ENH) pour l'hybride Mb-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂], nous n'avons pas pu mesurer le potentiel électrochimique de l'hybride Mb-[Co(dmgbH)₂(H₂O)₂] du fait de la superposition de la vague électrochimique correspondant au couple Co(II)/Co(I) avec celle correspondant au couple H⁺/H₂. Le fait d'observer cette vague à un potentiel entre -0.6 V et -0.8 V (*vs* ENH) montre cependant que ce potentiel est suffisant pour réduire le complexe de cobalt dans l'enveloppe protéique et catalyser la réduction de protons.

Ces résultats sont en accord avec le fait que les hybrides sont actifs pour la production d'hydrogène. La couleur bleue observée au début de la catalyse est en accord avec la réduction du cobalt(II) en cobalt(I) lors de la catalyse.

Plus précisément, nous n'avons pas observé d'activité catalytique pour l'hybride Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] que ce soit en photoréduction avec la déazaflavine ou avec le réducteur chimique Eu-EGTA alors que dans les mêmes conditions la cobaloxime est catalytiquement active. Ce résultat est en accord avec le fait que le potentiel du couple Co(II)/Co(I) est plus négatif (de 100 mV) dans la myoglobine que lorsqu'il est seul en solution. On a pu mesurer en effet une différence de 10 mV (*vs* ENH).

Dans le cas de la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ nous avons observé une production d'hydrogène quel que soit le potentiel électrochimique du réducteur utilisé. L'observation d'une vague électrocatalytique autour de -0.6V (*vs* ENH) lors des études électrochimiques confirme bien que ce potentiel est suffisamment négatif pour que la cobaloxime catalyse la production d'hydrogène en présence de myoglobine ou non.

3.2. Influence de la nature du complexe

Comme nous l'avons expliqué plus haut, les études électrochimiques peuvent expliquer le fait qu'on observe ou non une catalyse de production d'hydrogène suivant le réducteur utilisé. Nous avons observé des différences d'activité catalytique des complexes suivant leur nature. Lorsque les complexes sont seuls en solution la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ a montré une activité catalytique globalement meilleure que la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et que le complexe de cobalt diimine dioxime de cobalt $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$, comme nous l'avons montré par exemple figure 169 dans le cas du réducteur Eu-DTPA. Ce résultat est inverse aux résultats observés pour la catalyse de réduction de protons en milieux organiques ou en milieux mixtes organiques/eau, même si ceux-ci doivent être pris avec précaution, les conditions de pH étant différentes. En effet, en milieu organique, la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ catalyse la production d'hydrogène en présence d'acides faibles alors que les complexes $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$ sont actifs uniquement en présence d'acides forts.¹² Ainsi, au pH de nos études (pH 6 pour les études avec le ruthénium et pH 7 pour les autres) il est normal d'observer une meilleure activité catalytique avec les hybrides à base de $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$. Cela laisse supposer que la diminution du pH pourrait permettre d'augmenter les activités catalytiques observées particulièrement dans le cas des hybrides obtenus à partir de $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$. Nous avons déjà observé une grande augmentation de l'activité catalytique de $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et de Mb- $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ à pH 6 (en présence de ruthénium) par rapport à l'étude à pH 7 en présence de déazaflavine. Une étude en pH avec le même réducteur ou avec le même photosensibilisateur permettra de déterminer l'influence uniquement du pH sur l'activité catalytique des hybrides. Cette étude est actuellement en cours. Elle devra être couplée à une étude de stabilité des protéines en fonction du pH pour déterminer la limite basse à ne pas dépasser pour que la protéine soit toujours repliée correctement autour du complexe.

En milieux non aqueux, comme nous l'avons expliqué dans le chapitre I, les ponts BF_2 de la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ permettent de la protéger contre l'hydrolyse des ligands

glyoximes. Cette protection lui confère une plus grande stabilité se concrétisant par une meilleure activité catalytique globale que la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$. Le complexe diimine dioxime de cobalt, par la présence d'un pont propylène formant un ligand aminé tétradente autour du cobalt, est encore plus stable face à l'hydrolyse et a ainsi montré une meilleure activité catalytique. Dans nos conditions il semble bien que la stabilité du complexe dans l'hybride soit un paramètre crucial puisque l'activité catalytique globale a augmenté par ajout lent de réducteur. La faible activité des hybrides basés sur $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ peut également être mise en relation avec l'observation de la dégradation du signal, mesuré avec les électrodes modifiées, lors de l'enregistrement de plusieurs cycles. Il est possible que l'espèce, réduite à l'état Co(I) , se dégrade et empêche l'accomplissement de plusieurs cycles catalytiques.

3.3. Influence de l'enveloppe protéique

Enfin la nature de l'enveloppe protéique influence également l'activité catalytique de l'hybride et particulièrement dans le cas de l'insertion de la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ qui a montré les meilleurs résultats. Quelles que soient les conditions de catalyse utilisées, les hybrides basés sur la myoglobine ont montré une activité catalytique plus faible que ceux basés sur les hème oxygénases. Malgré la grande similarité des structures primaire, secondaire et tertiaire de l'hème oxygénase 1 de rat (HO1) et de l'hème oxygénase de *Corynebacterium diphtheriae* (HmuO), les hybrides formés avec ces deux protéines et la cobaloxime ont montré des activités catalytiques différentes. Ainsi en réduction avec le complexe Eu-EGTA, l'activité catalytique de HO1- $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ est légèrement supérieure à celle de HmuO- $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (6 cycles catalytiques contre 5). Dans ces conditions l'activité catalytique des hybrides basés sur l'hème oxygénase est plus de deux fois supérieure à celle du complexe libre en solution. La différence est beaucoup plus marquée en condition de photocatalyse avec la déazaflavine. En effet dans ces conditions l'hybride HmuO- $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ a montré une activité catalytique 2.5 fois plus grande que l'hybride HO1- $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$. Il s'agit de la meilleure activité catalytique mesurée pour les hydrogénases artificielles étudiées lors de cette thèse.

4. Conclusion

Il ressort de ces études que l'enveloppe protéique (même avec uniquement de légères différences comme pour HO1 et HmuO) influence l'activité catalytique du complexe de cobalt.

Cette influence est dépendante de la nature du complexe ainsi que du réducteur mis en jeu dans la catalyse. Les hybrides basés sur l'hème oxygénase ont montré les meilleures activités catalytiques. Cela peut s'expliquer par le fait que biologiquement il s'agit d'une protéine impliquée dans des réactions d'oxydoréduction lors de la catalyse de dégradation de l'hème en biliverdine et donc dont la structure est plus adaptée aux échanges électroniques entre le cofacteur et un partenaire. Nous pouvons trouver cependant dans la littérature ou dans la nature l'existence de transferts électroniques entre la myoglobine et des partenaires extérieurs. En effet la met-myoglobine incorporant l'hème à l'état ferrique interagit par exemple en milieux biologiques avec le cytochrome b5.²¹⁰ Ce complexe enzymatique est impliqué dans la réduction de l'hème. Le groupe d'Hayashi en 1998²¹¹ a également montré qu'il est possible d'avoir un transfert électronique entre une porphyrine de fer modifiée insérée dans la myoglobine et le cytochrome c natif.

Dans tous les cas nous avons pu montrer au travers de cette étude que les hybrides préparés sont actifs pour la production d'hydrogène. L'optimisation des conditions d'étude ainsi que du couple protéine/complexe de cobalt nécessite une étude détaillée de l'influence de tous les paramètres, ce que nous n'avons pu terminer par faute de temps. Cependant nous avons pu identifier des conditions optimales d'études : ajout lent de réducteur Eu-EGTA et photoréduction par la déazaflavine pour la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et les hybrides associés, photoréduction par le Ru pour la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et les hybrides associés. Nous avons pu également identifier des conditions de catalyse pour lesquelles la présence de la protéine améliore l'activité du complexe. En effet l'hybride HO1- $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ a montré une activité 2.5 fois supérieure à la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ en présence de réducteur Eu-EGTA.

Nos investigations nous ont permis d'obtenir dans les meilleures conditions des activités catalytiques raisonnables pour des tests catalytiques en milieu uniquement aqueux et à pH neutre. En effet, les seuls résultats de la littérature concernant une hydrogénase artificielle obtenue de manière similaire c'est-à-dire avec un site catalytique situé dans une enveloppe protéique sont ceux du groupe d'Hayashi avec l'incorporation de complexes dinucléaire de fer dans le cytochrome c. Ce système effectue 5.6 cycles catalytiques dans des conditions photocatalytiques avec $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]\text{Cl}_2$ comme photosensibilisateur et l'ascorbate comme donneur d'électrons sacrificiel. Nos investigations ont permis d'obtenir, dans les meilleures conditions, des activités catalytiques bien meilleures avec jusqu'à 15 cycles catalytiques pour l'hybride HmuO- $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ avec la déazaflavine comme photosensibilisateur.

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

Conclusion et Perspectives

L'objectif de ce travail de thèse était la préparation, la caractérisation et l'étude de l'activité catalytique d'enzymes artificielles actives en solution aqueuse pour la production d'hydrogène.

Dans un premier temps nous avons mis au point une méthode générale permettant de préparer des systèmes hybrides basés sur des hémoprotéines et des complexes de cobalt, connus pour être de bons catalyseurs pour la réduction de protons en milieu organique. Nous avons ainsi préparé différents systèmes hybrides à partir principalement de myoglobine de cachalot et d'hème oxygénase 1 de rat. Les catalyseurs inorganiques utilisés sont des cobaloximes ($[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$) ainsi qu'un complexe diimine dioxime de cobalt $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$.

Dans un second temps, nous avons caractérisé ces différents hybrides par plusieurs méthodes spectroscopiques et effectué leur modélisation par mécanique moléculaire. Nous avons ainsi montré que l'histidine fixant naturellement l'hème dans l'holo-hème oxygénase et dans l'holo-myoglobine se coordine également au centre cobalt des complexes introduits. Les hybrides basés sur la myoglobine de cachalot se sont montrés stables sans dissociation du complexe à faible concentration (10 μM). Néanmoins les complexes sont plus sensibles à l'oxydation lorsqu'ils sont incorporés au sein de l'enveloppe protéique.

Dans le cas de la cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, des études en résonance paramagnétique électronique nous ont permis de qualifier l'environnement du complexe dans la protéine. Ainsi dans la myoglobine le complexe est dans un environnement très hydrophobe. Dans le cas de l'hème oxygénase on observe la formation de deux espèces quel que soit le complexe incorporé dans la protéine. Ces deux espèces ont des environnements différents. La première espèce a un environnement très ouvert sur le milieu extérieur alors que la deuxième possède un environnement très hydrophobe, semblable à celui procuré au sein de la myoglobine.

Dans un troisième temps, nous avons préparé des électrodes modifiées permettant d'étudier les propriétés électrochimiques des hybrides basés sur la myoglobine grâce à leur affinité avec les nanotubes de carbone. Les potentiels électrochimiques du couple $\text{Co(II)}/\text{Co(I)}$ des complexes de cobalt sont affectés par l'environnement protéique. Ces caractéristiques ont pu être mises en relation avec les propriétés catalytiques des hybrides.

L'activité des hybrides formés pour la production d'hydrogène a été évaluée dans différentes conditions de catalyse et de photocatalyse. Tous les hybrides formés ont montré une activité catalytique et il ressort de cette étude que l'activité des hybrides est fortement dépendante du milieu (notamment son pH) mais également du réducteur utilisé. Ainsi dans les meilleures conditions nous avons pu obtenir jusqu'à 15 cycles catalytiques pour l'hybride HmuO-[Co(dmgh)₂(H₂O)₂] (HmuO étant l'hème oxygénase de la bactérie *Corynebacterium diphtheria*). Dans certains cas également l'environnement protéique a permis d'augmenter l'activité catalytique du complexe (d'un facteur 2.5 par exemple dans le cas de l'hybride HO1-[Co(dmgh)₂(H₂O)₂]) par rapport à celle observée pour le complexe seul en solution.

Ces premiers résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour la caractérisation et l'étude fonctionnelle d'enzymes artificielles basées sur une hémoprotéine et des complexes de cobalt. Tout l'enjeu est de trouver le bon couple protéine-catalyseur inorganique permettant d'obtenir une hydrogénase artificielle avec la meilleure propriété catalytique. Dans ce cadre l'étude d'autres hémoprotéines (comme par exemple FixL sur qui nous avons commencé des travaux préliminaires) comme protéine hôte ou la mutation de certains acides aminés sont à prévoir. L'identification des acides aminés pouvant influencer l'activité catalytique de l'enzyme artificielle pourra être faite grâce à des études de modélisation au niveau QM/MM. La formation des hybrides avec la myoglobine étant un processus irréversible il pourrait également être intéressant d'étudier l'interaction de la myoglobine avec des complexes de cobalt immobilisés au préalable sur électrodes. En outre on peut envisager de produire des enzymes artificielles incorporant à la fois l'activité catalytique et celle d'absorption de lumière. Le photosystème I (PSI) a en effet été fonctionnalisé par le groupe de J. Golbeck avec une hydrogénase.²¹²⁻²¹⁴ On peut donc imaginer fonctionnaliser le photosystème I avec les complexes de cobalt. Une fois cette fonctionnalisation effectuée il sera alors possible d'incuber l'hybride PSI-complexe de cobalt avec la myoglobine avec d'obtenir un système protéique hybride photosensibilisateur-catalyseur.

MATERIELS

ET

METHODES

Matériels et Méthodes

1. MATERIEL BIOLOGIQUE

1.1. Souche bactérienne *Escherichia coli* BL21(DE3)

Cette souche de bactérie est utilisée pour surproduire la myoglobine de cachalot dont le gène, dans le plasmide pET17b-Mb, est sous la dépendance du promoteur du phage T7. L'insert chromosomique DE3 est issu du phage λ et contient le gène codant pour la T7 RNA polymérase. Il est sous contrôle du promoteur lacUV5, inductible par l'IPTG (isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside).

1.2. Souche bactérienne *Escherichia coli* DH5 α

Cette souche de bactérie est utilisée pour la multiplication de plasmides. D'une part elle est déficiente en endonucléase I (endA) spécifique de l'ADN, ce qui améliore la qualité de préparation d'ADN; d'autre part, la mutation sur le gène recA la rend déficiente pour la recombinaison homologue et évite donc les risques de mutation du plasmide au cours de sa préparation.

1.3. Plasmide pET17b

Le plasmide contient en amont du site de clonage un promoteur T7, pTac, servant d'initiateur de la transcription sous le contrôle de l'IPTG comme inducteur (333-349). Il possède également le gène bla (2241-3098) qui lui confère la résistance à l'ampicilline.

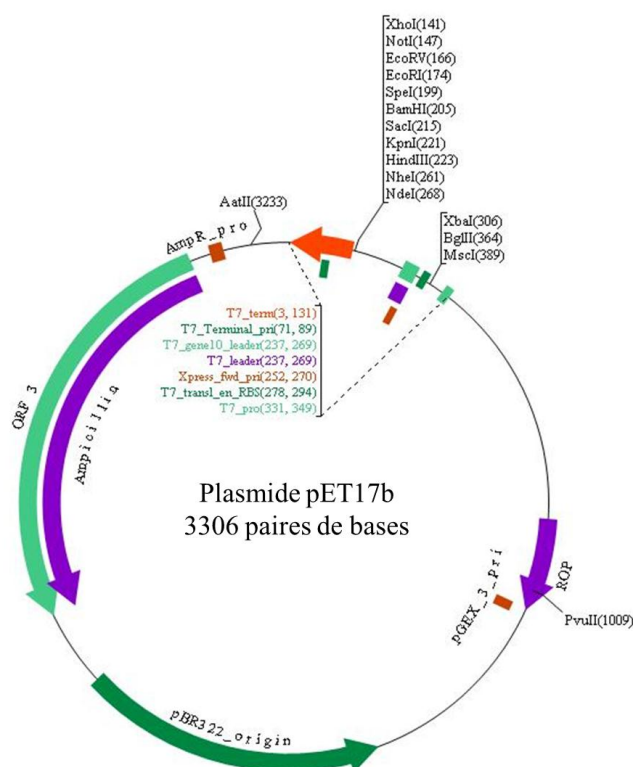


Figure 181. Plasmide pET17b.

Ce vecteur a été modifié en pET17b-Mb, utilisé pour la surexpression de la myoglobine de cachalot, et le gène codant pour la myoglobine de cachalot a été inséré entre les sites de restriction Nde I (268) et BamH I (205). Ce dernier nous a été fourni par V. Forge (Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, CEA Grenoble)^{167,169}

1.4. Fiche caractéristique Mb

Nom de la protéine : Myoglobine

Nom du gène : MB

Organisme : Cachalot - Physeter catodon (Sperm whale) (Physeter macrocephalus)

Longueur de la séquence : 154 Acides aminés.

Masse moléculaire : 17200 Da

Point Isoélectrique théorique : 8.7

Epsilon (280 nm) : 15.5 mM⁻¹.cm⁻¹

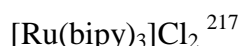
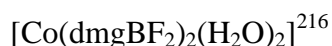
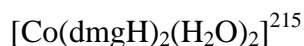
Epsilon de l'hème dans la protéine (409 nm) : 157 mM⁻¹.cm⁻¹

Fonction : Transporteur de l'oxygène.

2. MOLECULES CHIMIQUES

EuCl₂, EGTA (Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacétique acide) et DTPA (Diethylenetriaminepentaacétique acide) ont été achetés chez Sigma Aldrich.

Les composés chimiques suivants ont été synthétisés selon les protocoles décrits dans la littérature :



Synthèse de $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$:

Dans un ballon purgé et placé sous atmosphère d'azote ou d'argon, Co(OAc)₂·4H₂O (8 mmol) est mis en suspension dans 40mL d'éther diéthylique dégazé puis la diméthylglyoxime (2 équivalents) et BF₃·Et₂O (10 équivalents) sont ajoutés. La solution est agitée sur la nuit puis filtrée au moyen d'une canule et lavée à l'éther et à l'eau dégazés. La pureté de la poudre obtenue une fois séchée sous vide est vérifiée par électrochimie.

3. INSTRUMENTS ET MATERIELS TECHNIQUES

Les spectres d'absorption UV/Vis ont été enregistrés avec un spectrophotomètre Shimadzu UV-1800 CE 230 V dans des cuves en quartz de 1 cm de trajet optique, les mesures d'absorbance ont été réalisées avec le même spectrophotomètre dans des cuves en plastique de 1 cm de trajet optique.

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été obtenus avec un spectropolarimètre JASCO J-810. Pour les mesures en UV lointain (195-250 nm) on a utilisé une cuve de 1mm de trajet optique et pour les mesures en UV proche (300nm-500 nm) on a utilisé une cuve de 1cm de trajet optique.

Les mesures de fluorescence ont été obtenues avec un spectrofluorimètre JASCO FP-750.

Les spectres RPE ont été mesurés à 5K dans des tubes en quartz de 4mm de diamètre avec un spectromètre RPE Brüker, bande X.

Les gels d'électrophorèse ont été réalisés avec un générateur Bioblock Scientific microcomputer electrophoresis power supply.

Les solutions protéiques ont été centrifugées avec centrifugeuse Sigma 3-16 PK Fisher Bioblock Scientific, soniquées avec un sonicateur Misonix, modèle XL2020 et purifiée avec un chromatographe FPLC Äktapurifier. Les colonnes utilisées sont une colonne de Gel filtration est une colonne Superdex 75 Hiload 16/60 Prepgrade et les colonnes échangeuses d'ions HiTrap 1mL SP HP ou Q XL. La colonne NAP 10 est une Sephadex G-25

Les mesures de pH ont été réalisées avec un pH-mètre Hanna Instruments HI9321

Les mesures d'électrochimie ont été faites avec un potentiostat/galvanostat SP300 de chez Biologic Instrument.

La concentration en hydrogène dissous a été mesurée un senseur à hydrogène de chez Unisense.

4. PARTIE EXPERIMENTALE BIOLOGIE MOLECULAIRE

4.1. Préparation de cellules compétentes

Pour pouvoir incorporer un plasmide au sein de cellules il faut avant tout rendre leur membrane perméable au plasmide (c'est-à-dire les rendre compétentes). Pour cela on fait une culture de cellules qu'on désire rendre compétentes dans un milieu LB 200 mL, jusqu'à ce que l'absorbance de la solution à 600 nm atteigne environ 0,4 (phase exponentielle). Les cellules sont ensuite incubées 10 minutes dans la glace puis centrifugées à 5000 rpm pendant 10 min à 4°C.

Le surnageant est éliminé et le culot est séché 1 min puis resuspendu dans 20 mL de tampon Tris pH 8 50mM + 10% glycérol + 0.1M CaCl₂ et incubé 30 min dans la glace. On recommence l'opération en resuspendant le culot final dans 4 mL. La solution est aliquotée en tube de 100µL en chambre froide puis les aliquots sont rapidement congelés et stockés à -80°C. Pendant toute la préparation on fait attention aux éventuelles contaminations. Un test de non contamination est effectué par test de croissance cellulaire sur une boîte de Pétri LB avec ampicilline. Les cellules compétentes n'étant pas résistantes à l'ampicilline elles ne se développeront uniquement si elles sont contaminées par un plasmide portant la résistance à l'ampicilline.

4.2. Transformation de cellules compétentes

A 100 μ L de cellules compétentes sont ajoutés 2 μ L de plasmide (correspondant à une quantité de 20 ng à 50 ng). La solution est incubée 40 min dans la glace puis on procède à un choc thermique à 42°C pendant 45 s afin de fragiliser la membrane lipidique des cellules et favoriser ainsi l'insertion du plasmide.

Ensuite 2 méthodes sont envisageables :

- Soit 900 μ L de milieu LB-Agar sont ajoutés et les cellules sont incubées sous agitation (600 rpm) à 37°C pendant 2 h. Les cellules sont ensuite étalées sur boîte de pétri LB-Agar-ampicilline et incubées à 37°C sur la nuit. Une colonie est prélevée, ajoutée à une culture de 5 mL de milieu LB et ampicilline (100 mg/L) et incubées à 37°C sous agitation pour la nuit.
- Soit les 102 μ L de solution cellulaire sont dilués dans un tube de culture contenant 5 mL de milieu LB + ampicilline (à 100 mg/L) et sont incubés sous agitation à 37°C sur la nuit.

4.3. Préparation d'ADN plasmidique

Cette étape est réalisée à l'aide du kit Miniprep (BIO BASIC INC – protocole « Low Copy Plasmid DNA ») qui permet d'extraire et de purifier l'ADN plasmidique à partir de 3 à 5 mL de culture de cellules d'*Escherichia coli* DH5 α transformées avec le plasmide désiré.

Après collecte des cellules par centrifugation à 5000 rpm pendant 10 min, on les resuspend dans une solution contenant de la RNase A puis on y ajoute une solution de NaOH/SDS afin de fragiliser les membranes et de libérer protéines et ADN. Après incubation d'une minute, une solution d'acétate de potassium est ajoutée afin de précipiter les protéines et l'ADN chromosomiques. L'ADN plasmidique est récupéré dans le surnageant après centrifugation à 12000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est alors injecté sur une colonne de silice (colonne EZ-10) présentant une grande affinité avec l'ADN plasmidique en présence d'une forte concentration en sel. Après lavage à l'éthanol pour éliminer les sels, l'ARN et les protéines, l'ADN plasmidique est élué avec un tampon de faible force ionique (eau ou tampon Tris 10 mM pH 8.5). L'ADN plasmidique ainsi purifié est stocké à -20°C jusqu'à utilisation.

5. PARTIE EXPERIMENTALE BIOCHIMIE

5.1. Production d'apo-MbSw

5.1.1. Protocole standard

Le protocole standard utilisé peut être divisé en cinq étapes :

Dans un premier temps le plasmide est incorporé dans les cellules compétentes BL21(DE3)* (étape de transformation).

A 100 μ L de cellules compétentes d'Echerischia Coli BL21(DE3)* est ajouté 1 μ L de vecteur pet17b (correspondant environ à 20 ng) et la solution est placée dans la glace pendant 30 min. On procède alors à un choc thermique pour perméabiliser la membrane à l'ADN plasmidique en plaçant la solution 2 min au bain marie à 42°C puis 2 min dans la glace. Ensuite 900 μ L de milieu LB sont ajoutés sous hotte à flux laminaire et la solution est agitée 1 h à 37°C. Après centrifugation à 7000 rpm pendant 3 min 900 μ L de surnageant sont enlevés et le culot est repris dans les 100 μ L restant. Les 100 μ L de cellules transformées sont étalées sur une boîte de Petri (gel d'agarose + ampicilline) et laissés à incuber la nuit à 37°C.

On peut ensuite faire une préculture d'une colonie de cellules ayant incorporé le plasmide dans un petit volume de milieu LB. Cette étape permet d'optimiser la croissance cellulaire dans les volumes de 1 L utilisés par la suite. Concrètement, une colonie de cellule est diluée dans 100 mL de milieu LB contenant 100 μ L d'ampicilline (à 100 mg/mL correspondant à une concentration finale de 100 μ g/L) et incubée sur la nuit à 37°C.

La troisième étape consiste à cultiver les cellules dans des volumes de 1 L : A 1 L de milieu LB sont ajoutés 1 mL d'ampicilline (à 100 mg/mL correspondant à une concentration finale de 100 μ g/L) et 15 mL de préculture. Le milieu est incubé à 37°C jusqu'à obtenir une absorbance à 600 nm d'environ 0.8 (environ 4h30) correspondant à la phase exponentielle de croissance cellulaire.

L'expression de la myoglobine est alors induite par ajout de 1 mL d'IPTG (1M préalablement filtré). Après 5 h, le milieu de culture est ensuite centrifugé à 4000 rpm à 4°C pendant 20 min afin d'isoler le culot cellulaire. Le culot est resuspendu dans 25 mL de tampon A (Tris 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 10 mM pH 8) pour être lavé puis la solution est à nouveau centrifugée à 7000 rpm à 4°C pendant 15 min et le culot est congelé.

La lyse des cellules a été réalisée par ajout de lysozyme. Après décongélation lente du culot cellulaire, ce dernier est resuspendu dans environ 30 mL de tampon A. Du lysozyme (20 mg/mg de cellules), MgCl₂ (20 mM) et DNase I (40 U/mL) sont ajoutés. La solution est

incubée 1 heure dans la glace puis centrifugée à 30000 rpm pendant 15 min. Le surnageant est éliminé et on conserve le culot contenant les corps d'inclusion.

Les corps d'inclusion sont solubilisés par sonications dans une solution de TFA 0.1% (acide trifluoroacétique)

Typiquement, la moitié d'un culot est repris dans 30 mL d'une solution 0.1% TFA dans l'eau et soniqué dans la glace 7 fois à puissance 7 pendant 30 s avec 1 minute de pause entre chaque sonication. La solution est ensuite centrifugée 15 min à 30000 rpm, le surnageant est conservé et le culot obtenu est repris dans 30 mL de solution 0.1% TFA. Cette opération est répétée au total 6 fois. Les différents surnageant obtenus comportant la myoglobine sont combinés et dialysés sur la nuit dans du tampon Tris/acétate 20mM pH 5 dans un volume $100 \times V_{\text{initial}}$.

La protéine précipitée est éliminée par centrifugation. Une seconde dialyse du surnageant est ensuite effectuée contre le tampon final de manipulation Tris/HCl 50 mM pH 7.5. On obtient alors environ 20mg d'apomyoglobine de cachalot fonctionnelle.

5.1.2. Purification supplémentaire par Gel filtration Sephadex

La colonne est préalablement équilibrée avec du tampon 50mM Tris/HCl pH 8 + 20mM NaCl (tampon A). Entre 150 μ l et 2 ml suivant les essais de solution protéique (composées majoritairement de myoglobine à des concentrations entre 10 mg/ml et 30 mg/ml), préalablement dialysés contre le tampon A sont injectés sur la colonne. Le tampon A est élué jusqu'à annulation de l'absorbance en UV (à 280 nm) (environ 200 ml)

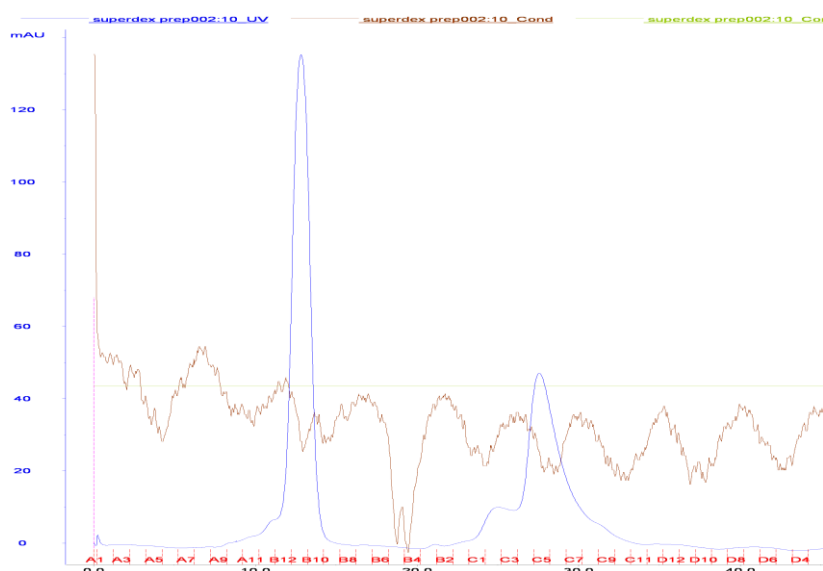


Figure 182. Chromatogramme obtenu lors de la 2^{ème} étape de purification avec une colonne de gel filtration préparative. Marron : conductivité, bleu : Absorbance à 280 nm en fonction du volume d'élution. Le premier pic correspond à la myoglobine purifiée.

La figure ci-dessus présente le chromatogramme obtenue. Les deux pics d'absorbance observés vers 14 mL d'élution et 28mL d'élution correspondent respectivement à la myoglobine de cachalot et à l'impureté. Ces deux protéines ont été analysées par gel SDS-PAGE (figure 183).

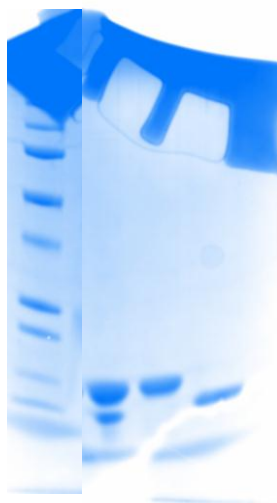


Figure 183. Gel SDS/PAGE de protéines lors de la colonne de gel filtration dont le chromatogramme est représenté figure 182. De gauche à droite : marqueur moléculaire, protéines injectées, protéine du premier pic (myoglobine), protéine du deuxième pic.

D'autres méthodes d'extraction et de purification des protéines ont été testées lors la première préparation des protéines. Les modes opératoires sont décrits ci-après.

5.1.3. Lyse des cellules par sonication

4,4 g de cellules sont décongelées et resolubilisées dans 22 ml de tampon Tris/HCl 50 mM pH 8.

Sont ajoutés :

- 3 μ l d'une solution 1M de PMSF dans l'acétone
- 150 μ l d'une solution 1M de DTT dans du tampon Tris/HCl 50mM pH8
- 8 ml de tampon afin d'avoir un volume suffisant pour plonger la sonde du sonicateur entièrement

La solution est transférée dans un bécher en plastique et plongée dans l'azote liquide afin d'obtenir une croûte gelée autour de la solution

La solution est soniquée en faisant attention que la glace ne soit pas complètement fondue. Après chaque sonication, elle est recongelée dans l'azote liquide. Cette étape est reproduite 5 fois puis la solution est centrifugée à vide, à 4°C et à 20 000 g pendant 20 min.

Les surnageants et les culots sont séparés. Lorsque la myoglobine est soluble après culture elle est présente dans le surnageant alors que lorsqu'elle est exprimée sous forme de corps d'inclusion elle se retrouve dans le culot.

5.1.4. Précipitation de l'ADN

Lorsque la protéine est soluble :

400 mg de sulfate de streptomycine sont dissous dans 2 ml de tampon Tris/HCl 200 mM pH 7. A 4°C, 220 mg de sulfate de streptomycine (1,1 ml) sont ajoutés goutte à goutte à 30 mL du surnageant obtenu après lyse des cellules. La solution est laissée sous agitation en chambre froide pendant 30 min puis centrifugée à 8000 tours/min pendant 20 min. Le surnageant (vert-translucide) et le culot (blanc) sont séparés.

Des aliquots de 1ml des extraits cellulaires obtenus sont réalisés dans l'optique de tests de purification.

5.1.5. Purification par colonnes Q Sépharose ou CM Sépharose

Les essais de purification ont été faits sur 1 mL d'extraits cellulaires issus de la surexpression de la myoglobine de cachalot chez *E.Coli*. Le protocole a été identique pour toutes les colonnes, seul le tampon et le chromatogramme obtenu différaient. L'essai de purification sur Q Sepharose à pH 9 a donc été choisi comme modèle.

La colonne est préalablement équilibrée avec du tampon 20 mM Tris/HCl pH 9 (tampon A).

2mL d'extraits cellulaires préalablement dialysés contre le tampon A sont injectés sur la colonne. Le tampon A est élué jusqu'à annulation de l'absorbance en UV (flowthrough) puis un gradient de tampon Tris/HCl 20mM pH 9 + 1M NaCl (tampon B) est réalisé. 0-2,5% (5min), 2,5%-20% (20min), 20%- 50% (15min), 50%-100% (20min). La figure 184 présente le chromatogramme obtenu et la figure 185 le gel des fractions obtenues.

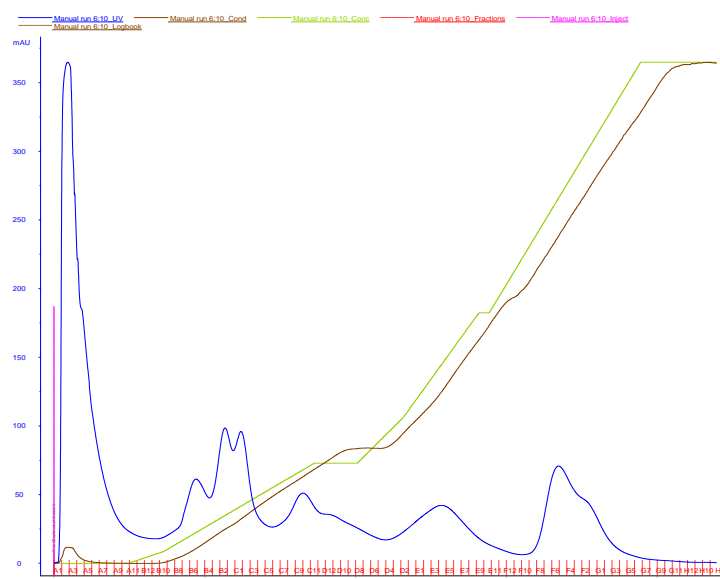


Figure 184. Chromatogramme obtenu lors de l'essai de purification par Q Sepharose à pH9. Marron : conductivité, bleu : Absorbance à 280nm, vert : concentration en tampon B en fonction du volume d'élution

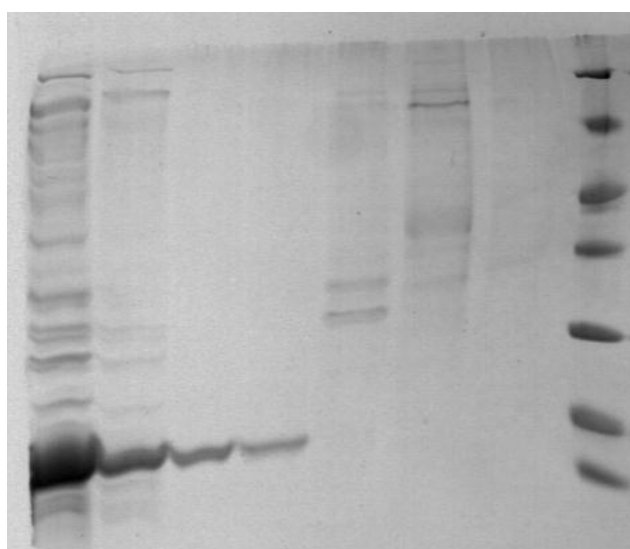


Figure 185. Gel SDS-PAGE 15% des fractions obtenus après l'essai de purification par Q Sepharose à pH 9. De gauche à droite : A2-A3/A4-A7/B7-B4/B1-C4/C8-E8/F8-F3/F2-G3/ Marqueur moléculaire.

5.1.6. Précipitation des protéines

Principe :

Le sulfate d'ammonium est un sel permettant d'augmenter la force ionique du tampon et assez bien toléré par les protéines. Quand la concentration en sulfate d'ammonium (caractérisée par le pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium de la solution) est assez élevée pour priver une protéine des molécules d'eau qui l'hydratent, celle-ci précipite. Comme les protéines n'ont

pas la même tolérance à la présence de sulfate d'ammonium, cette technique permet de les séparer.

La quantité de sulfate d'ammonium à ajouter pour passer d'un palier de concentration à un autre est connue de manière empirique par la figure 186 :

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																			
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100			
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																			
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0		
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5		
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10		
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15		
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20		
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25		
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30		
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35		
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40		
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45		
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50		
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55		
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60		
									0	31	63	97	132	168	205	244	65		
										0	32	65	99	134	171	209	70		
											0	32	66	101	137	174	75		
												0	33	67	103	139	80		
													0	34	68	105	85		
														0	34	70	90		
															0	35	95		
																0	100		

Figure 186. Tableau permettant de connaître la quantité de sulfate d'ammonium à ajouter à une solution initiale pour obtenir un pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium

Mode opératoire :

Le test a été réalisé sur 1mL d'extraits cellulaires (C=16 mg/ml, m=16mg, Tampon Tris 50 mM pH8 (tampon A))

- 176 mg de sulfate d'ammonium sont ajoutés aux extraits cellulaires (passage de 0% à 30% de saturation) en chambre froide (4°C) et la solution y est agitée pendant 1 h puis centrifugée à 15 000 tours/min pendant 30 min. Le surnageant (S30) est séparé du culot (C30).

- C30 est resolubilisé dans un minimum de tampon A (500µL généralement) tandis que 121 mg de sulfate d'ammonium sont ajoutés (passage de 30% à 50% de saturation) à S30. Le même protocole est appliqué et le surnageant (S50) est séparé du culot (C50)

- C50 est resolubilisé dans un minimum de tampon A tandis que 130 mg de sulfate d'ammonium sont ajoutés (passage de 50% à 70% de saturation) à S50. Le même protocole est appliqué et le surnageant (S70) est séparé du culot (C70)

- C70 est resolubilisé dans un minimum de tampon A tandis que 146 mg de sulfate d'ammonium sont ajoutés (passage de 70% à 90% de saturation) à S90. Le même protocole est appliqué et le surnageant (S90) est séparé du culot (C90)

5.2. Préparation d'hybrides protéiques

Solution stock d'hème : 2 mg d'hème (3 μmol) sont dilués dans 500 μL de MeOH et 1 mL de NaOH 10 mM. On obtient une solution soluble et stable à 1 mM en hème.

5.2.1. Reconstitution d'holo-myoglobine de cachalot

De manière générale on procède en 2 temps :

1- Incubation

2 équivalents d'hème (1mM dans une solution stock MeOH/NaOH/H₂O) sont ajoutés à une solution d'apo-myoglobine en s'assurant que le volume d'hème ajouté reste inférieur à 1/3 du volume total afin d'éviter la précipitation de la protéine. La solution est incubée 1 h dans la glace en remuant régulièrement. La solution passe de marron/vert à rouge.

Typiquement : à 1mL de protéine de 100 μM (correspondant à 0.1 μmol de protéine) sont ajoutés, par volume de 20 μL , 200 μL d'hème dilué à 1 mM dans une solution MeOH/NaOH/H₂O.

2- Elimination de l'excès d'hème non insérés par colonne d'exclusion stérique (NAP10)

La colonne est tout d'abord équilibrée avec 20 ml de tampon, puis la solution à purifier est injectée sur la colonne. Après adsorption de la solution sur la colonne le volume est complété jusqu'au 1 ml si cela est nécessaire. Une fois ce volume adsorbé, la colonne est éluée avec le tampon d'équilibration. Le premier millilitre comprend la majorité de la protéine (80% environ lorsque le volume de protéine ajouté initialement est de 1mL, moyenne obtenue sur un grand nombre des expériences effectuées. Cette proportion peut augmenter si on diminue le volume initial) et est dépourvu de toute trace de complexe. Les 0.5mL suivant sont composés des 20% de protéines restantes ainsi que de traces de complexe libre. La majorité du complexe libre est élué dans le volume suivant. Si le volume de la protéine à purifier est compris entre 1 mL et 2.5 mL on peut alors utiliser une NAP25 à la place du NAP10. Dans ce cas la totalité de la protéine est éluée en 3.5 mL. On a pu observer des traces de complexe à partir de 2.5 mL d'élution.

Typiquement : Une solution de 900 μL de myoglobine ($m=1.4\text{ mg}$, $n= 8.3 \cdot 10^{-8}\text{mol}$) avec 2 équivalents d'hème est chargée sur la colonne NAP10 préalablement équilibrée. Une fois le volume adsorbé, 100 μL de tampon sont ajoutés. On récupère ensuite l'holo-myoglobine en éluant 1 mL de tampon. On récupère alors 1.2 mg de protéine ($C=1.2\text{ mg/ml}$, $V=1\text{ ml}$, $m=1.2\text{ mg}$).

5.2.2. Insertion de complexes solubles dans l'eau dans une protéine hôte

On procède de la même manière avec les différentes protéines et les différents complexes étudiés.

1- Incubation

A 1 mL de solution protéique est ajouté 5,10 ou 20eq de complexe (suivant les complexes et leur affinité avec la protéine). La solution est incubée 1h dans la glace en remuant régulièrement.

2- Elimination de l'excès de complexe non insérés par colonne d'exclusion stérique (NAP10)

On élimine ensuite l'excès de complexe présent en passant l'échantillon sur NAP10 comme décrit précédemment et en récupérant le premier millilitre de l'élution. Cf. 2.2.4.1. *Colonne d'exclusion stérique : « NAP 10 » (élution tampon Tris pH 7 50mM)*

Typiquement :

Incubation de $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$:

Toutes les préparations se font en anaérobiose.

Une fraction de myoglobine, $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et une colonne NAP 10 sont introduits en boîte à gant anaérobiose.

Une solution de $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (326g/mol) à 1 mM est préparée dans du tampon Tris/HCl 50mM. A une solution de myoglobine (en solution dans du tampon Tris/HCl pH 7, 500 μL , 3.6 mg/mL, 1.8 mg, 0.1 μmol) sont ajoutés, lentement avec homogénéisation continue, 5 équivalents de cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (500 μL , 1 mM, 0.5 μmol). La solution obtenue (jaune vif) est agitée environ 1 h à 4°C puis élué sur une colonne NAP 10 préalablement équilibrée. On récupère alors 1.2 mg de protéine (0.07 μmol , 1 mL, 1.2 mg/mL).

Incubation de $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$:

Toutes les préparations se font en anaérobiose.

Une fraction de myoglobine, $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ et une colonne NAP 10 sont introduits en boîte à gant.

Une solution de $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (420.8 g/mol) à 1 mM est préparée dans du tampon Tris/HCl 50 mM. A une solution de myoglobine (en solution dans du tampon Tris/HCl pH 7, 500 μL , 0.1 mM, 1.7mg/mL, 0.85 mg, 0.05 μmol) sont ajoutés, lentement avec homogénéisation continue, 10 équivalents de cobaloxime $[\text{Co}(\text{dmgBF}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (500 μL , 1 mM, 0.5 μmol). La solution obtenue (jaune vif) est agitée environ 1h à 4°C puis éluee (après ajout de 30 μL de tampon supplémentaire une fois la protéine adsorbée sur colonne) sur une colonne NAP 10 préalablement équilibrée. On récupère alors 0.76 mg de protéine (0.04 μmol , 1 mL, 0.76 mg/mL).

Incubation de $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$:

Une solution de $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$ (458.1 g/mol) à 8.5 mM est préparée dans du tampon Tris/HCl 50 mM.

A une solution de myoglobine (en solution dans du tampon Tris/HCl pH 7, 500 μL , 3.6mg/mL, 1.8 mg, 0.1 μmol) sont ajoutés, lentement avec homogénéisation continue, 16 équivalents de complexe diimine dioxime de cobalt $[\text{Co}\{(\text{DO})(\text{DOH})\text{pn}\}\text{Cl}_2]$ (192 μL , 1.63 μmol). La solution obtenue (jaune-orange) est agitée environ 1h à 4°C puis purifiée par NAP10 selon le protocole standard. On récupère alors 1.4 mg de protéine (0.08 μmol , 1 mL, 1.4 mg/mL).

5.2.3. Insertion de complexes non solubles dans l'eau (ou en concentration trop faible) dans une protéine hôte

On procède de la même manière avec les différentes protéines et les différents complexes étudiés. La différence par rapport aux complexes solubles dans l'eau est le volume maximal limité de complexe que l'on peut ajouter à une solution protéique afin d'éviter la précipitation de la protéine. Pour une solution de complexe dans du MeOH le volume maximal ajouté est de 6% du volume protéique initial. Pour une solution de complexe dans le DMSO, le volume maximal ajouté est de 1% du volume protéique initial.

1- Incubation

A 1 mL de solution protéique est ajouté 5,10 ou 20 eq de solution de complexe (suivant les complexes et la sensibilité de la protéine à leur présence et de manière à ce que le volume

ajouté n'excède pas 100µL pour 1mL de solution protéique). La solution est incubée 1h dans la glace en remuant régulièrement.

2- Elimination de l'excès de complexe non insérés par colonne d'exclusion stérique (NAP10)

On élimine ensuite l'excès de complexe présent en passant l'échantillon sur NAP10 comme décrit précédemment. Cf. 2.2.4.1. *Colonne d'exclusion stérique : « NAP 10 » (élution tampon Tris pH 7 50mM).*

5.2.4. Traitement après incubation

5.2.4.1. *Colonne d'exclusion stérique : « NAP 10 » (élution tampon Tris pH 7 50mM)*

Après 1h d'incubation à froid (à 4°C), la solution (de volume maximal 1 ml) est éluée sur une colonne d'exclusion stérique préalablement équilibrée avec 20 ml de tampon, puis la solution à purifier est injectée sur la colonne. Après absorption de la solution sur la colonne, si le volume de protéine est inférieur à 1 mL, du tampon est ajouté pour compléter le volume jusqu'à 1 mL. Une fois ce volume absorbé sur la colonne, 1ml de tampon est ajouté conduisant à l'élution d'une fraction protéique correspondant à environ 80% de la quantité initiale. Les 0.5 mL suivants sont composés des 20% complémentaires ainsi que de traces de complexe libre. On analyse donc uniquement la fraction de 1 mL comprenant l'adduit protéique.

5.2.4.2. *Concentration sur membrane*

Ces membranes retiennent les macromolécules globulaires de poids moléculaire supérieur à une valeur donnée. Pour l'apo-myoglobine il nous a fallu utiliser une membrane de 3000 Da.

5.2.4.3. *Dialyse*

Il s'agit d'une méthode utilisée pour purifier des solutions de protéines contenant un contaminant de faible poids moléculaire. L'échantillon est placé dans un boudin constitué d'une membrane perméable aux espèces de petites tailles. On place ce boudin dans un grand volume de tampon (de volume minimal 100 fois le volume de l'échantillon) ce qui permet à la concentration en contaminant de diminuer dans le boudin. L'équilibre de dialyse est atteint en environ 4h. Afin d'obtenir une élimination optimale il faut réitérer l'opération 2 ou 3 fois.

5.3. Analyse de protéines

5.3.1. Préparation des solutions

-Bleu dénaturant :

composants	quantité
Tris 1M pH 6,8	12,5 mL
SDS 20%	4g
Glycérol 100%	20 mL
BBP 2%	2,5 mL
B. Mercapto	9 mL
q. s. p H ₂ O	50 mL

-Tampon de migration :

composants	quantité
Tris base	30 g
Glycine	144 g
SDS	10 g
q. s. p H ₂ O	1 L

5.3.2. Préparation des échantillons

A partir de cellules : 1 mL de culture bactérienne est prélevé. Après centrifugation à 10000 rpm pendant 10 min, le culot est resuspendu dans 50 μ L de bleu dénaturant. Les échantillons sont portés à 95°C 5 min puis centrifugés 5 min à 15000 rpm pour éliminer les débris membranaires et l'ADN chromosomique. Le surnageant contient les protéines solubles.

Dans le cas d'une analyse d'une solution protéique 10 μ L de bleu dénaturant est ajouté à une solution de 40 μ L de protéine. La solution protéique doit être à un pH alcalin afin d'être analysable par cette technique pour éviter de mauvaises réactions avec le bleu dénaturant. L'échantillon est chauffé 1 min à 95°C puis centrifugé 3 min à 15000 rpm (si l'échantillon n'est pas contaminé par de l'ADN aucun précipité ne doit être formé).

5.3.3. Electrophorèse sur gel SDS/PAGE

5.3.3.1. Principe

L'électrophorèse est une méthode d'analyse basée sur la migration différentielle de particules chargées (les protéines) dans un champ électrique. Ce protocole permet d'estimer la surexpression de la protéine directement dans les cellules sans préparer les extraits solubles selon le protocole d'extraction standard ou d'estimer la pureté d'une solution protéique. Pour une bonne observation des protéines on dépose sur gel 80 µg d'extraits protéique et 10 µg de protéines pures.

5.3.3.2. Mode opératoire

L'électrophorèse est réalisée en conditions dénaturantes : 5 à 20 µg de protéines sont dénaturées par chauffage à 95°C dans du tampon de dénaturation (Tris-HCl 1M pH 6.8, SDS 10%, glycérol 15%, BBP 2%, β-mercaptoéthanol 2%). Le β-mercaptoéthanol réduit les ponts disulfures, ôtant ainsi la structure tridimensionnelle native des protéines, alors que le sodium dodecyl sulfate (SDS) est un détergent qui rompt les interactions inter et intra-protéiques et qui se fixe sur les protéines, les chargeant négativement. La charge propre de chaque protéine devient ainsi négligeable. Les protéines migrent donc selon leur poids moléculaire et non leur charge.

Les échantillons protéiques dénaturés sont déposés dans les puits d'un gel de polyacrylamide contenant du SDS. La concentration en polyacrylamide dépend de la masse des protéines d'intérêts : plus elles sont petites, plus le gel devra être concentré. Généralement 3 concentrations différentes sont utilisées : 10%, 12% et 15%. Etant donné la faible taille de la myoglobine (17200 Da), tous les gels de protéines sont de 15%.

Le gel de polyacrylamide est constitué d'un gel de séparation (pour un gel de 15% : 3 ml Acryl/bisacryl, 1,8 ml Tris 1M pH 8.8, 1,2 ml Glycérol 50%, 60 µl SDS 10%, 4 µl TEMED, 30 µl APS) surmonté d'un gel de concentration (0,85mL Acryl/Bisacryl, 0,78 ml Tris 1M pH 6.8, 3,4 ml Eau Distillée, 60 µl SDS 10%, 4µl TEMED, 25µl APS). Ce dernier permet une migration homogène des protéines qui vont donc se concentrer au sommet du gel de séparation, afin de garantir la pénétration simultanée de toutes les protéines de l'échantillon dans ce gel.

Les protéines vont ensuite migrer lors du passage d'un courant électrique de 180 V et de 45 mA pendant 1,1 h. Le gel joue un rôle de tamis moléculaire, séparant les protéines selon leur masse. La masse apparente des protéines est évaluée grâce au calibrage du gel par des protéines

de poids moléculaire connu (de la plus lourde à la plus légère : 116 kDa, 66.2 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 18.4 kDa, 14.4 kDa). Les bandes correspondant aux protéines sont révélées par coloration du gel au bleu de Coomassie (bleu de Coomassie 0.25%, méthanol 45%, acide acétique 10%, glycérol 10%) puis décoloration dans une solution méthanol 30%, acide acétique 10%.

5.3.4. Analyse par spectrométrie de masse

Une fois le gel coloré et décoloré on peut prélever une bande correspondant à une protéine afin de l'analyser par spectrométrie de masse. Après avoir bien nettoyé le support sur lequel se fera la découpe (savon, eau chaude, eau distillée) on découpe au scalpel la bande de protéine d'intérêt afin qu'elle mesure 1mm³. Le morceau de gel prélevé est stockée dans du tampon de décoloration et analysé rapidement. Les analyses ont été effectuées par la plateforme d'analyses protéomiques « EDyP-Service » du CEA Grenoble.

5.3.5. Transfert sur membrane pour séquençage N_{terminal}

La séparation de différentes protéines par électrophorèse est également utilisée pour séquencer une protéine particulière. Pour cela il ne faut pas colorer le gel SDS/PAGE après la migration. On effectue donc un dépôt en miroir des protéines sur le gel afin de pouvoir colorer la moitié et identifier la bande d'intérêt. L'autre moitié du gel est utilisé pour transférer les protéines sur membrane de nitrocellulose.

5.3.5.1. Matériels

En plus du gel SDS/PAGE (après migration par électrophorèse) et de la membrane de nitrocellulose SemiBlott, on a besoin pour le transfert de quatre papiers buvards et de deux éponges de la même dimension que le gel.

Ce transfert se fait avec le même matériel que l'électrophorèse avec un tampon de transfert de composition :

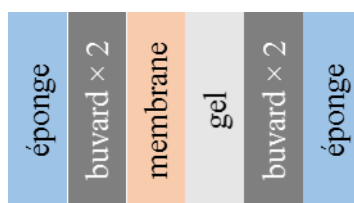
composants	quantité
CAPS 100mM pH11	200mL
MeOH	200mL
q. s. p H ₂ O	2L

5.3.5.2. Protocole

Une fois préparé le tampon de transfert est gardé à 4°C.

1- La membrane de transfert est humidifiée dans une boîte de Pétri dans du méthanol puis 5min dans le tampon de migration.

2- Les différentes pièces sont assemblées suivant le schéma ci-dessous. Le gel et la membrane sont entourés de deux papiers buvard et d'une éponge.



La construction ainsi formée est compressée dans le tampon de transfert afin d'éliminer toute les bulles pouvant être piégées entre les couches et placée dans le porteur de gel de l'électrophorèse. La migration se fait dans la glace à 50 V, 170 mA pendant 30 min.

La membrane est ensuite rincée à l'eau et colorée au rouge Ponceau. Si le transfert a eu lieu des bandes de protéine se colorent en rose. La bande d'intérêt est découpée et stockée dans l'eau pour le séquençage. Le séquençage N_{terminal} a été effectué par Jean-Pierre Andrieu du Groupe de Réponse Immunitaire aux Pathogènes et au Soi altéré de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble.

5.4. Dosages

5.4.1. Dosage du cobalt

Le dosage du cobalt a été réalisé par spectrométrie de flamme au CHU de Grenoble par Mme Josiane Arnaud

5.4.2. Dosage au rose bengal

Tous les dosages de protéines ont été réalisés par cette méthode.

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer la concentration en protéines d'un échantillon : méthode de Bradford, acide bicinchonique (BCA)...

La concentration des protéines en solution a été déterminée par dosage colorimétrique au rose bengal,²¹⁹ une méthode peu utilisée mais présentant l'avantage d'être moins sensible à la présence de métaux que le dosage Bradford.

5.4.2.1. Matériels

- Solution de HSA (Human Serum Albumin) à 10 mg/mL dans l'eau préparée à partir de HSA commerciale lyophilisée et stockée à -20°C
- Solution de rose bengal à 1 mg/mL (dans l'eau)
- Tampon phosphate de potassium (10 mM) à pH 6.8
- Solution d'acide acétique 50% (v/v)
- Eau distillée, tubes eppendorfs 2 mL et cuves UV-visibles

5.4.2.2. Préparation de la gamme étalon

La gamme étalon est préparée par dilutions successives à partir d'une solution mère de HSA de concentration 1 mg/mL (dans du tampon phosphate de potassium pH 6.8) préparée par dilution de la solution stocke à 10 mg/mL

Sol. mère (µg/mL)	100	50	25	12,5	100	20	10	5	100	30
Vol. à prélever (mL)	1	1	1	1	0,4	1	1	1	0,6	1
q.s.p Tp KP (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
[sol. finale] (µg/mL)	50	25	12,5	6,25	20	10	5	2,5	30	15

1 ml de chaque échantillon est prélevé et 50 µl d'une solution aqueuse de rose Bengal 1 mg/ml est ajoutée. Après homogénéisation la solution est incubée à température ambiante pendant 2 à 3 min. 50 µl d'acide acétique 50% (en volume) est ajouté rapidement, la solution est vortexée et transférée dans une cuve spectrophotométrique de 1.5 ml. L'absorbance est mesurée à 560 nm.

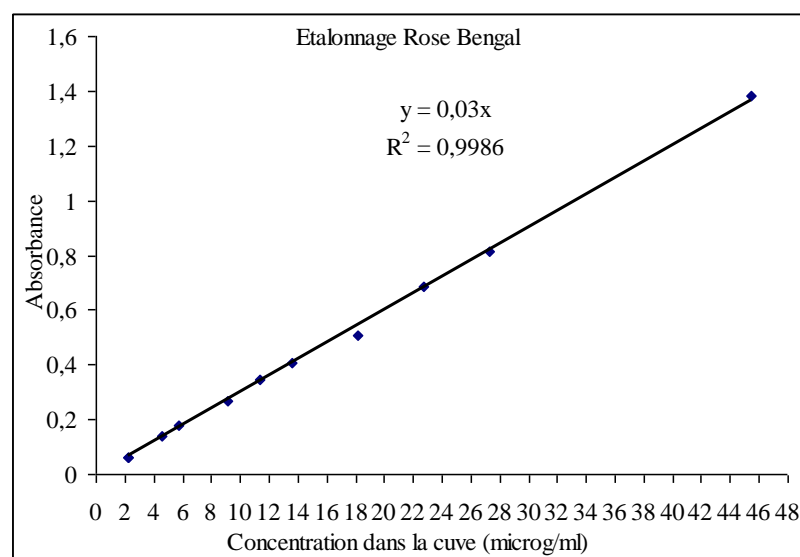


Figure 187. Droite d'étalonnage de l'absorbance en de la solution a 560 nm en fonction de la concentration en protéine de cette solution (µg/ml).

5.4.2.3. Dosage d'une solution protéique de concentration inconnue

Une fois la droite d'étalonnage réalisée, les solutions protéiques de concentration inconnue sont réalisées à partir de 2 à 10 μL de solution à doser, complétée à 1 mL avec du tampon phosphate de potassium à pH 6.8. Ensuite le même protocole est appliqué.

6. TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES

6.1. La spectroscopie par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)

6.1.1. Principe

La spectroscopie RPE permet d'étudier les espèces paramagnétiques contenant un ou plusieurs électrons non appariés. L'entité paramagnétique est placée dans un champ magnétique H variable et reçoit une onde électromagnétique d'énergie $h\nu$.

Lorsque l'énergie $h\nu$ de l'onde est égale à l'énergie permettant la transition entre 2 états de spins de l'électron, il se produit le phénomène de résonance paramagnétique électronique. L'énergie de transition est égale à $g\beta H$, où g correspond au rapport gyromagnétique ($g_e = 2.0023$ pour l'électron libre) et β_e au magnéton de Bohr ($\beta_e = (e\hbar)/(4\pi m_e) = 0.9 \times 10^{-20}$ erg/gauss).

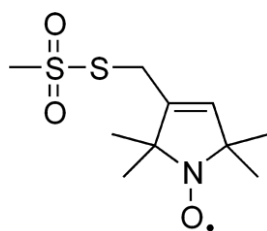
L'électron non apparié dans une orbitale moléculaire possède un facteur g dont la valeur diffère de celle de g_e en fonction du centre paramagnétique et de son environnement moléculaire proche. Le facteur g est anisotrope et peut donc être assimilable à une grandeur tensorielle définie par trois composantes g_x , g_y et g_z . Ces trois composantes correspondent aux points d'inflexions et aux extrema du spectre d'absorption enregistré au cours du balayage des valeurs de champs magnétique.

Le spectre obtenu expérimentalement est la dérivée du signal d'absorption pour laquelle la détermination des valeurs de g est plus précise.

6.1.2. Mode opératoire

200 μL de solution sont placés dans un tube RPE préalablement séché à l'étuve (en boîte à gant ou non suivant les besoins de la manipulation). Le tube est ensuite congelé lentement dans l'azote liquide. Lorsque l'appareil est prêt à être utilisé, le tube est introduit dans la cavité et l'échantillon est analysé.

Le nitroxyde utilisé pour la quantification est le MTSL (S-(2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)methyl methanesulfonylthioate) dont la structure est représentée ci-dessous. Il a été synthétisé par l'entreprise Reanal à Budapest (<http://www.reanal.hu/index.php>)



6.2. Quantification de l'hème fixé par la protéine

La variation de l'absorbance à 409 nm de la bande de Soret du fer en fonction du nombre d'équivalent d'hème ajouté permet de quantifier l'hème fixé à la protéine. Pour cela nous préparons les différentes solutions à 10 μ M en protéine avec 0 à 5 équivalents d'hème. Les spectres UV/Visible de chaque solution sont enregistrés.

On peut alors analyser le maximum de la bande de Soret du fer en fonction du nombre d'équivalent d'hème. On obtient alors deux droites dont l'intersection correspond au nombre maximum d'hème pouvant être inséré correctement dans la protéine comme sur le graphique ci-dessous.

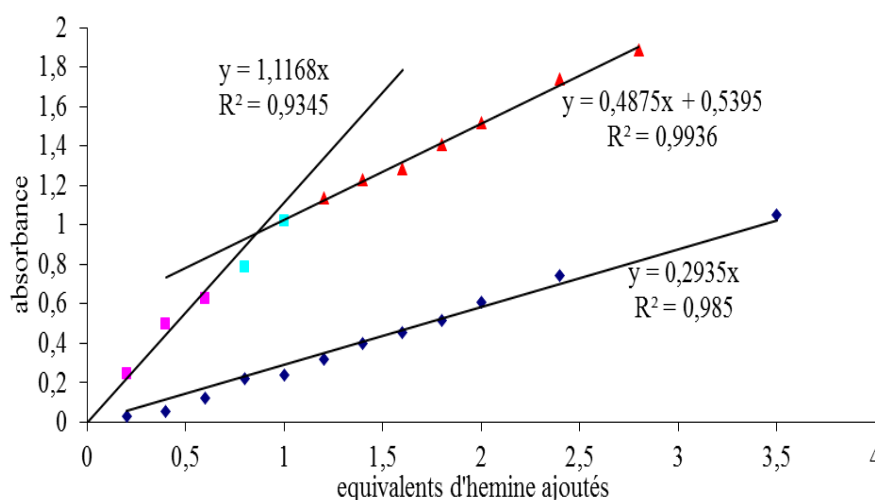


Figure 188. Absorbance à 409 nm de la solution de myoglobine en fonction du nombre d'équivalents d'hème ajoutés.

Les points bleus correspondent à la variation de l'intensité de la bande de Soret sans protéine. Les points rose, turquoise et rouge correspondent à la variation de l'intensité en présence de protéine (ici l'apo-myoglobine). D'une manière générale les regressions linéaires sont faites en excluant les points proches de l'intersection (en turquoise sur le graphique) afin de ne pas biaiser le résultats. Avec les équations des droites on peut remonter au nombre d'équivalent maximum d'hème ajouté s'insérant correctement dans la protéine.

6.3. Dichroïsme circulaire

6.3.1. Principe

Le dichroïsme circulaire permet d'avoir des informations sur la chiralité de l'environnement d'une molécule. Pour cela on mesure le spectre UV-visible avec une lumière incidente polarisée droite et gauche. Le spectre de dichroïsme circulaire est obtenu par différence.

6.3.2. Mode opératoire

Les mesures de dichroïsme circulaire ont été faites sur deux zones de longueur d'onde : 190 nm - 250 nm (UV lointain), nous permettant d'avoir des informations sur les structures secondaires des protéines et autour de 409 nm (UV proche) dans le cas de l'holo-myoglobine pour avoir des informations sur l'environnement de l'hème.

Les spectres sont accumulés 10 fois.

Paramètres de mesure : vitesse : 50 nm/min, une mesure/nm.

Concentration d'étude :

5 μ M en UV lointain dans une cuve de 300 μ L et de 1 mm de trajet optique

20 μ M en UV proche dans une cuve de 1 mL à 1 cm de trajet optique

6.4. Fluorométrie

6.4.1. Principe

La fluorescence est une sorte de photoluminescence et correspond à la désexcitation d'un électron. Techniquement l'électron est excité par irradiation à une longueur d'onde précise. Dans notre cas on a mesurée la fluorescence des résidus tryptophanes de la myoglobine à 280 nm. On enregistre alors le spectre d'émission entre 300 et 450 nm.

6.4.2. Mode opératoire

Les solutions sont préalablement préparées suivant les conditions décrites précédemment (concentration en protéine de 4.6 μ M environ). On utilise pour la mesure une cuve de fluorescence permettant à la fois l'excitation de l'échantillon et la mesure de l'émission. Les spectres sont mesurés à température ambiante. On utilise pour les mesures les paramètres suivants :

Bande passante en émission : 20 nm

Bande passante en excitation : 10 nm

Temps de réponse : 1 s

Sensibilité : faible

Le signal du tampon, correspondant au spectre Raman de l'eau, est mesuré et soustrait lors du traitement des informations.

6.4.3. Calcul de K_d

On appliqué la méthode décrite dans par Stan en 2009.¹⁸¹

La méthode appliquée à une mesure faite sur l'hybride Mb-[Co(dmgh)₂(H₂O)₂] est décrite. Cette même méthode a été appliquée à l'hybride Mb-[Co(dmghBF₂)₂(H₂O)₂].

Les spectres de fluorescence de la myoglobine avec différents équivalents de cobaloxime sont enregistrés (figure 189). On observe une diminution du maximum de fluorescence lors de l'augmentation de la concentration en complexe du fait du quenching de la fluorescence des tryptophanes de la protéine par le cobalt.

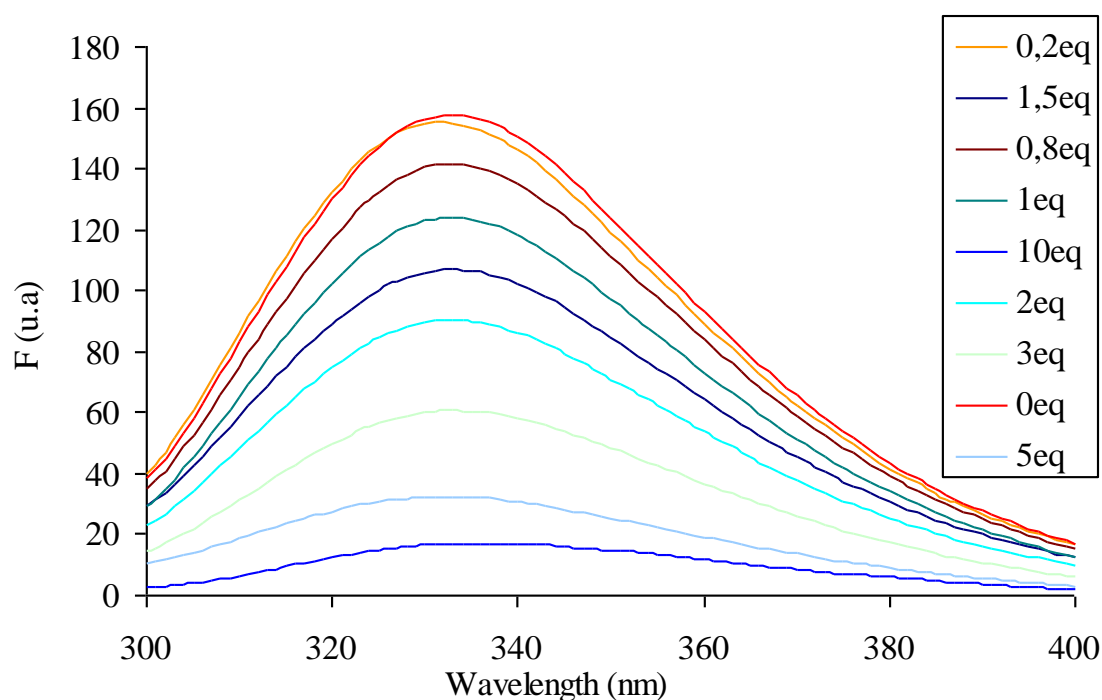


Figure 189. Spectre du fluorescence de la myoglobine en présence de différents équivalents de [Co(dmgh)₂(H₂O)₂].

On peut représenter le maximum de fluorescence du complexe en fonction du nombre d'équivalent et on peut voir que même à 10 équivalents de complexe le plateau n'est pas atteint et que cela coïncide avec un signal très faible.

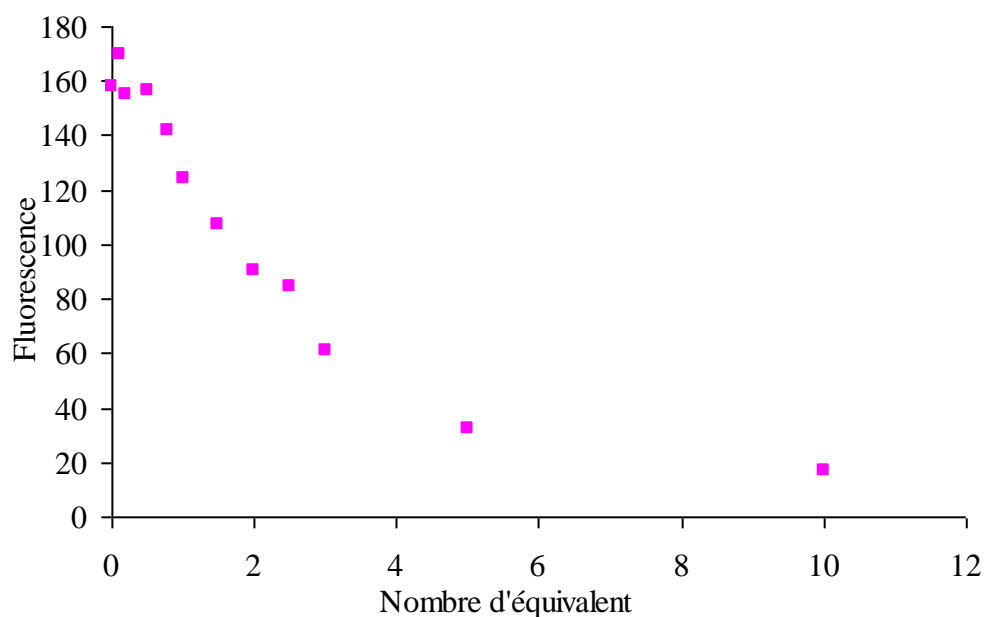
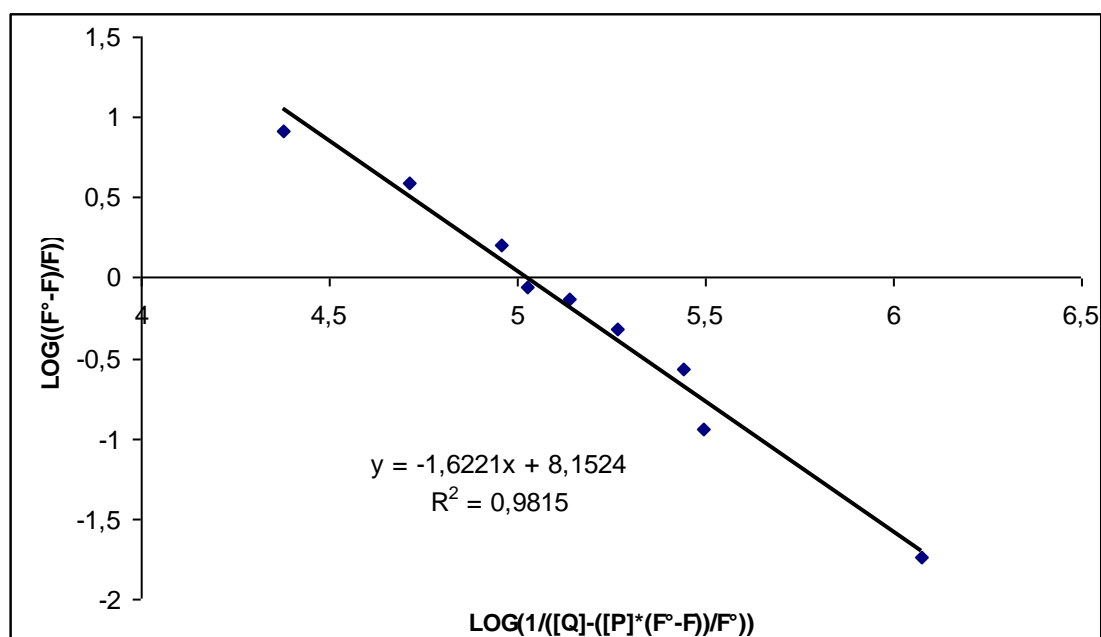


Figure 190. Maximum de la fluorescence de la myoglobine en présence de différents équivalents de $[\text{Co}(\text{dmgh})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$.

Si la forme fluorescente est en équilibre avec la forme non fluorescente, $\text{LOG}((F^\circ - F)/F)$ en fonction de $\text{LOG}(1/([\text{Co}] - ([\text{P}] * (F^\circ - F))/F^\circ))$. F correspond au maximum de fluorescence mesuré, F° correspond à la fluorescence initiale (avec 0 équivalent de complexe), $[\text{Co}]$ et $[\text{P}]$ sont les concentrations (M) respectivement en cobaloxime et en protéine.

Cette représentation graphique nous permet d'avoir accès au nombre de complexe coordonné à la protéine (n) et à la constante de dissociation associée à cet équilibre (K_d). En effet si on a un équilibre on obtient une droite de coefficient directeur ($-n$) et d'ordonnée à l'origine $-n * \log K_d$.



On obtient alors dans ce cas une constante de dissociation de 10 μM avec 1.6 complexe par protéine à l'équilibre. Ces résultats auraient donc pu être en accord avec l'existence d'un équilibre entre la protéine et la cobaloxime. Une étude approfondie de la littérature nous a montré qu'il existe un équilibre entre l'holo-myoglobine et l'hème. Il semble donc qu'on observe le même phénomène avec la cobaloxime et donc que l'on mesure les constantes associée à l'équilibre $\{\text{Mb}[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]\} - [\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$

7. DOCKING

7.1. Mécanique moléculaire

Les structures des protéines ont été extraites des fichiers pdb et les structures des complexes ont été créées avec le logiciel ProPKA obtenues à partir de calculs de DFT.

Le modèle OPLS-AA (pour Optimized Potentials for Liquid Simulations – All Atom) a été utilisé pour définir le champ de force. Les charges ont été calculées avec le programme ORCA. La contrainte entre l'histidine et le cobalt a été définie avec une distance d'équilibre de 1.9 Å et une force de 400.

7.2. Mécanique quantique

Seules les positions du complexe de cobalt, de l'histidine ainsi que de la molécule d'eau ont été optimisées par mécanique quantique. L'optimisation de la position de plus faible énergie du complexe a été calculée par la méthode quantique semi-empirique PM6 avec le même champ de force OPLS-AA que précédemment.

8. ELECTROCHIMIE

8.1. Préparation des électrodes

On utilise comme support une électrode tournante en carbone vitreux.

Des nanotubes de carbone (Nanocyl, nanotubes de carbones multi-parois C 100 de pureté > 95 %) en suspension homogène dans de l'éthanol (29 mg de nanotubes dans 210 mL d'éthanol) sont déposés par volume de 10 μ L jusqu'à recouvrement de la surface. Une fois la surface sèche on dépose une goutte de 15 μ L de protéine électroactive et on laisse la solution s'évaporer doucement à l'air. Suivant les expériences on a été amené à déposer en plus 15 μ L d'une solution de Nafion (5% massique dans l'éthanol densité du Nafion : 0.885).



Figure 191. Electrode à base de carbone vitreux.

Pour les électrodes en gel : A un mélange d'agar-agar liquide (1.6 g + 90 mL d'eau) est ajouté une solution de Tris/Acétate/EDTA (10 mL concentration 10 solution commerciale) pour la conductivité. A 400 μ L de nanotubes de carbone (2 mg dans 15 mL) est ajouté 400 μ L de gel afin d'améliorer la conductivité. Afin de faire adhérer le gel à l'électrode de carbone vitreux il a été nécessaire d'y faire un dépôt préalable de nanotubes de carbone.

Pour les études préliminaires un tissu de fibre de carbone (GDL pour Gaz Diffusion Layer) a été utilisé. La solution de nanotubes de carbone solubles est filtrée sur les GDL. Le dépôt de protéine est effectué comme précédemment.

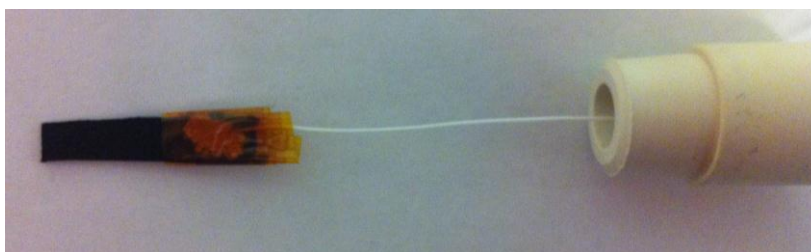


Figure 192. Electrode à base de GDL.

8.2. Mesures

Toutes les mesures d'électrochimie ont été faites sous atmosphère d'azote, en utilisant des solutions dégazées, à température ambiante, dans des cellules électrochimiques compartimentées en deux unités séparées par un verre fritté faites sur mesure. L'appareillage est constitué d'un ensemble potentiostat/galvanostat SP300 de chez Biologic Instrument.

Pour les mesures de voltammétrie cyclique faites en milieux aqueux, la configuration classique à trois électrodes utilisée comporte : une électrode modifiée préalablement préparée comme électrode de travail, un fil de platine comme contre-électrode et une électrode de référence au calomel saturé. La valeur du potentiel de l'électrode de référence est mesurée par ajout de ferrocyanide de potassium dans du tampon (potentiel de 436 mV par rapport à l'électrode au calomel saturé à pH 7).²²⁰ Les contrôles des expériences de voltammétrie cyclique sont effectués en utilisant une électrode de travail sans protéine.

Pour les mesures électrochimiques faites en milieu organique l'électrolyte support utilisé est le (n-Bu₄N)BF₄ (TBA/TFB) commercial. On se place alors dans l'acétonitrile dans des concentrations de l'ordre du mM en complexe. L'électrode de référence utilisée est alors une électrode de référence Ag/AgCl/KC_{aq} 3M + AgCl_{sat}. Son potentiel est vérifié par ajout de ferrocène dans la solution (0.45 V vs Ag/AgCl et 0.4 V par rapport à l'électrode normale à hydrogène).



Figure 193. Montage de mesure en électrochimie à base d'électrode modifiée.

9. DOSAGE DE L'HYDROGENE

La mesure de la concentration en hydrogène dissous dans la solution a été faite par une microélectrode de Clark.

9.1. Principe

L'électrode de mesure de l'hydrogène utilisée est une microélectrode de Clark combinée à une référence interne et à une anode. Le capteur est connecté à un picoampéromètre de haute sensibilité où l'anode est polarisée à une référence interne (+0.8 V de polarisation interne). De part une différence de pression partielle, l'hydrogène dissous diffuse au travers de la membrane et est oxydé à la surface de l'anode à base de platine. Le picoampéromètre convertit le courant d'oxydation en signal. Le courant, et donc le signal obtenu, est directement proportionnel à la concentration en hydrogène dissous dans la solution.

9.2. Etalonnage

Le signal obtenu étant parfaitement proportionnel à la concentration en hydrogène seules deux mesures sont nécessaires à l'étalonnage comme cela est expliqué dans le manuel d'utilisation et comme nous l'avons vérifié à différentes reprises. L'étalonnage s'est révélé nécessaire avant chaque expérience du fait de la diminution du signal obtenu pour la mesure d'une solution à la même concentration d'hydrogène sur des périodes de l'heure environ.

Pour l'étalonnage on mesure le signal dans une solution d'eau distillée et dans une solution saturée à 40% en hydrogène (correspondant à 320 μM en hydrogène à 21°C dans l'eau). On peut compléter par la mesure d'une solution saturée à 100% en hydrogène (correspondant à 800 μM à 21°C dans l'eau). Ces solutions sont obtenues en faisant buller pendant au moins 2 heures un mélange de gaz 40% H_2 /60% N_2 ou 100% H_2 respectivement.

9.3. Mesure

La mesure se fait dans un flacon adapté de 1mL permettant à la fois l'étanchéité vis-à-vis du milieu extérieur et le passage du microcapteur.

La solution à mesurer est préparée en anaérobie en boîte à gant. D'une manière générale 1 équivalent de complexe inorganique et 1.2 équivalents de protéine (afin de s'affranchir de l'erreur possible de dosage protéique) sont dilués de manière à obtenir un volume total de 1.1 mL (en comptant également le volume de réducteur ou de photosensibilisateur et de donneur d'électrons sacrificiel).

9.3.1. Par ajout de réducteur

Dans le cas de l'utilisation de complexe d'Europium comme réducteur chimique le réducteur est préparé en milieu anaérobie mais ajouté hors boîte à gant simultanément à la mesure de la concentration.

Typiquement :

En boîte à gant, 110 μL de myoglobine (2.2 mg/mL, 127 μM , 14 nmol, 1.27 équivalents) sont mélangés avec 11 μL de $[\text{Co}(\text{dmgH})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (1 mM, 11 nmol). Des solutions de EuCl_2 et du ligand à 400 mM dans du tampon Tris/HCl pH 8 1M sont préparées. Le mélange équimolaire de ces deux solutions nous permet d'obtenir une solution de Eu-DTPA ou Eu-EGTA à 200 mM dans du tampon Tris/HCl pH 8 1M. Hors boîte à gant et après mise en place du système de mesure jusqu'à 10 équivalents d'euporium sont ajoutés par seringue Hamilton.

9.3.2. Par photochimie

En photochimie le donneur d'électrons sacrificiel est ajouté dans le tampon d'étude en boîte à gant et le photosensibilisateur quant-à-lui est ajouté via l'utilisation d'une seringue hamilton simultanément à la mesure et à l'irradiation.

Typiquement pour [Ru(bipy)₃]Cl₂ utilisé comme photosensibilisateur :

En boîte à gant : A 175 µL de myoglobine (69 µM, 12 nmol pour une concentration finale de 30 µM) sont ajoutés 11 µL de [Co(dmgh)₂(H₂O)₂] (1 mM, 11 nmol pour une concentration finale de 10 µM) et 892 µL de tampon phosphate de potassium 50 mM, NaCl 150 mM Ascorbate 100 mM pH 6.

Une solution de [Ru(bipy)₃]Cl₂ à 10 mM dans l'eau est préparée.

Hors boîte à gant et une fois l'appareil de mesure mis en place, 22 µL (10 mM correspondant à 20 équivalents) sont ajoutés. Le mélange est simultanément irradié avec une lampe Xénon à 300 W munis d'un filtre UV.

Typiquement pour la déazaflavine utilisé comme photosensibilisateur:

En boîte à gant : A 478 µL de myoglobine (69 µM, 33 nmol pour une concentration finale de 30 µM) sont ajoutés 30 µL de [Co(dmgh)₂(H₂O)₂] (1 mM, 30 nmol pour une concentration finale de 27 µM). 481 µL de tampon Tris 50 mM pH 7.

La déazaflavine a été obtenue par Etienne Mulliez à une concentration de 1.4 mM (vérifiée par UV, epsilon (400 nm)=12000 M⁻¹ cm⁻¹).

Hors boîte à gant et une fois l'appareil de mesure mis en place 11 µL (1.4 mM correspondant à 0.5 équivalent) sont ajoutés. Le mélange est simultanément irradié avec une lampe Xénon à 300 W.

- ANNEXES -

ANNEXE 1

Tableau récapitulatif des différentes activités obtenues en production d'hydrogène (en nombre de cycle catalytique). Entre parenthèse se trouve la valeur moyenne obtenue dans les mêmes conditions. Le code de lecture est le suivant : style normal : ajout en 1 fois du réducteur, en gras : ajout progressif du réducteur ou du photosensibilisateur, en gras et en italique : test sans agitation.

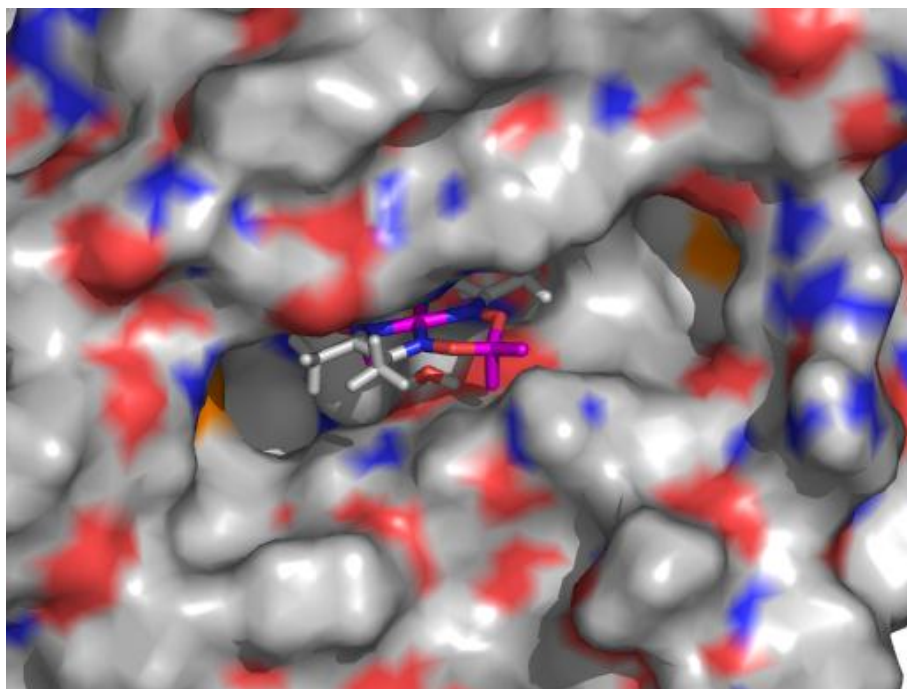
	Eu EGTA			EuDTPA		DAF		Ru
CoH	91µM	71µM	40µM	91µM	71µM	30 µM	10µM	10µM
CoH	3		2.3-2.5-2.7 (2.5 +/- 8%)	2.8-2 (2.4 +/- 17%)		8-8-7 (8.3 +/- 20%)	18-23 (20.5 +/- 12%)	7-7
MbCoH		3	2 3.3-4 (3.2 +/- 6%)		1.2	3-5 (4 +/- 25%)		1.5-3 (33%)
HO1CoH			6.3-6 (6.2 +/- 3%)		3		6.3-6 (6.15 +/- 2%)	
HmuOCoh			4.3-4.8-5.8 (5 +/- 16%)				16-14.5 (15.3 +/- 11%)	
FixLCoH								
CoB	91µM	71µM	40µM	91µM	71µM	30 µM	10µM	10µM
CoB	1.5-2 (1.75 +/- 14%)	1.5		1.8-2-2-1-1 (1.5 +/- 33%)		1.5-2-2.4-2.2 (2 +/- 20%)		5.5-5
MbCoB		0.3-0.3-0.2 (0.27 +/- 26%)		I- 0.8	0.8	0.5-0.8 (0.65 +/- 25%)		5-2.5 (3.75 +/- 33%)
HO1CoB			1	0.8				
HmuOCob			1					
FixLCoB								
CoD	91µM	71µM	40µM	91µM	71µM	30 µM	10µM	10µM
CoD				1.1	1			
MbCoD					0.7			

ANNEXE 2

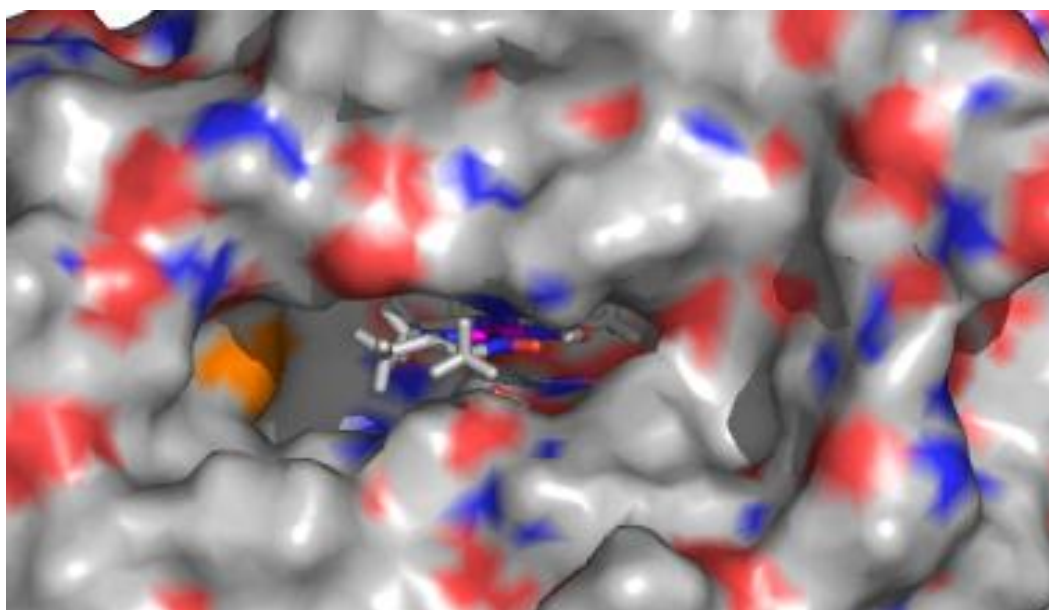
Structures des différents hybrides obtenues par étude de docking.

A base d'hème oxygénase 1 de rat :

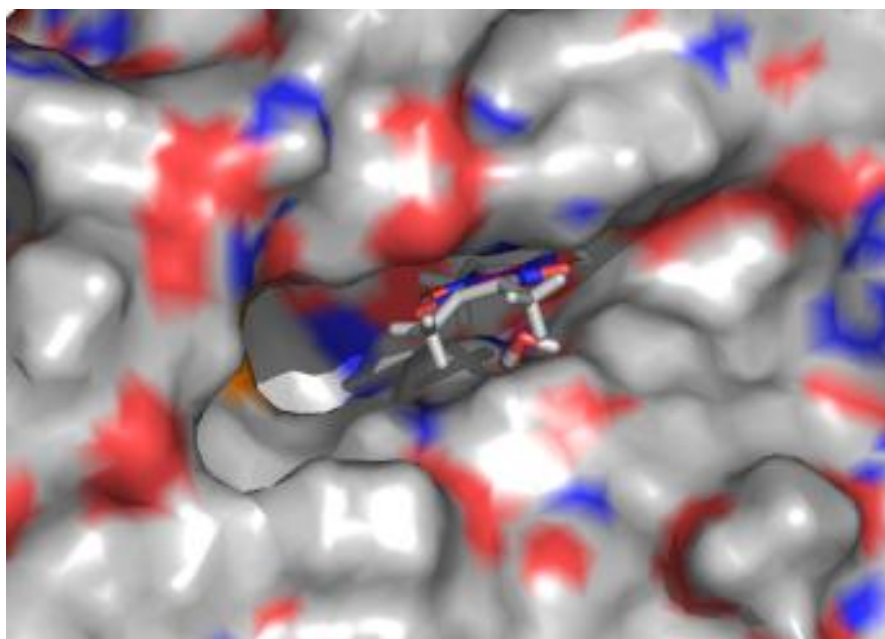
HO1-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂]



HO1-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂]

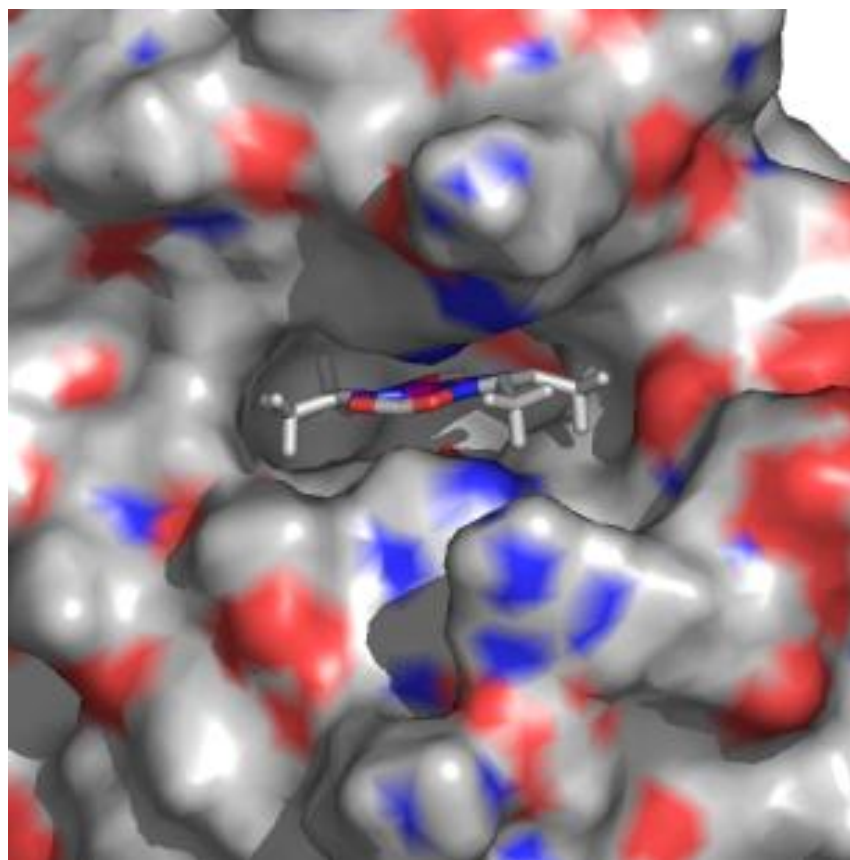


HO1-[Co(dmgh)₂(H₂O)₂]

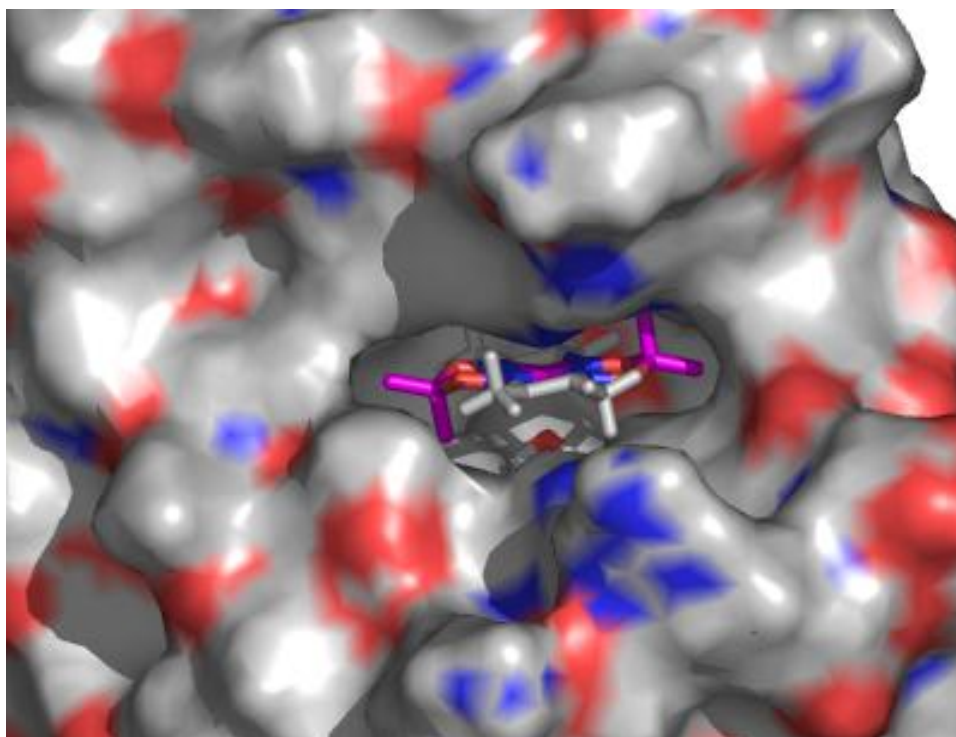


A base de myoglobine de cachalot :

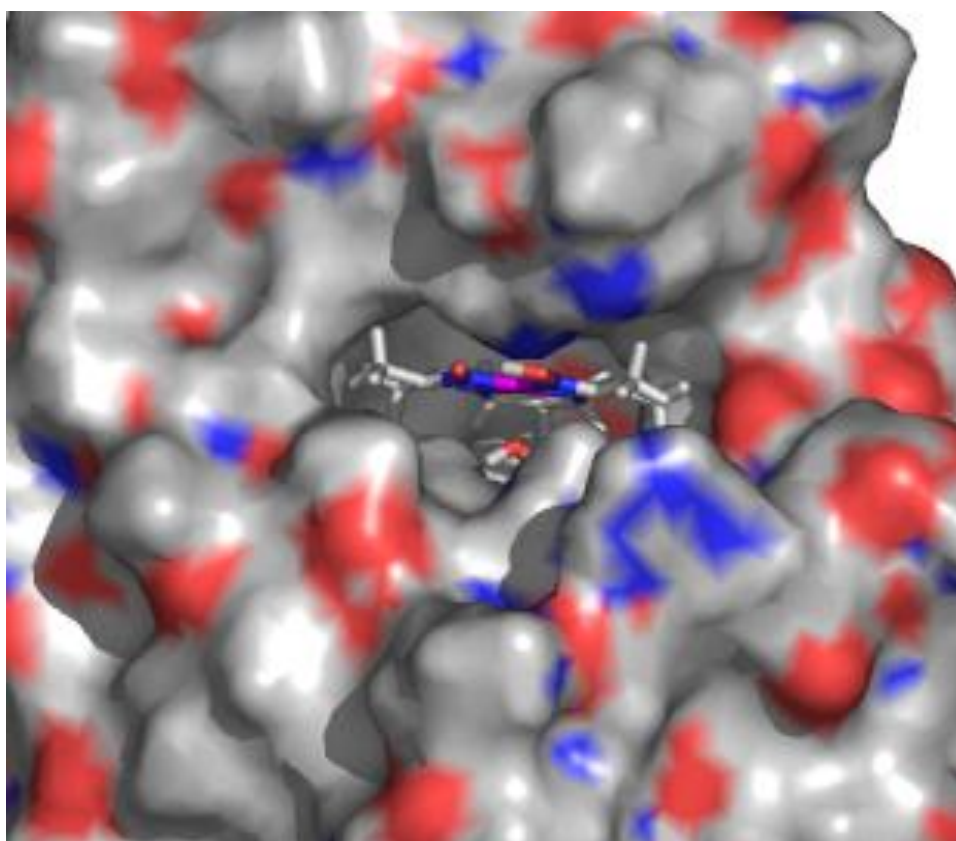
Mb-[Co(dmgh)₂(H₂O)₂]



Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂]

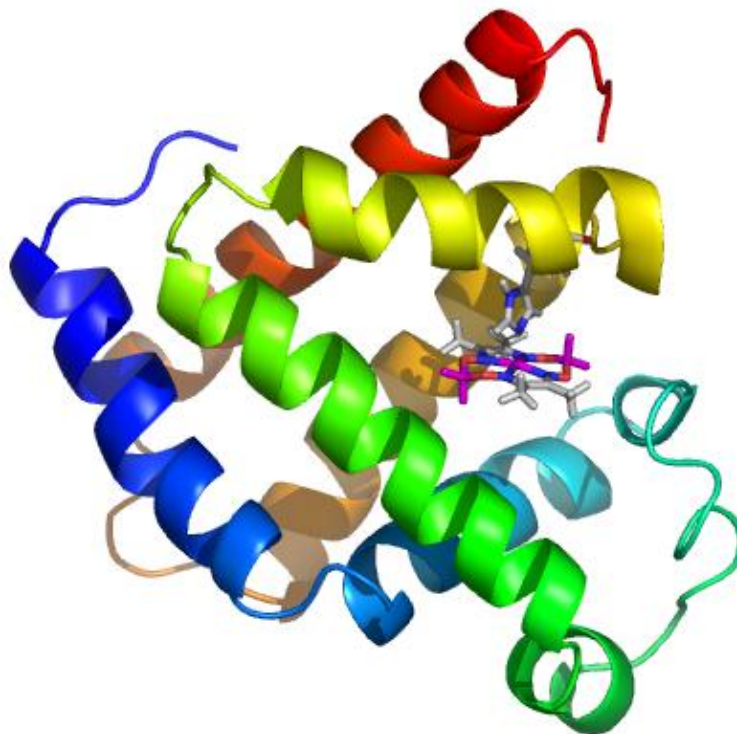


Mb-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂]

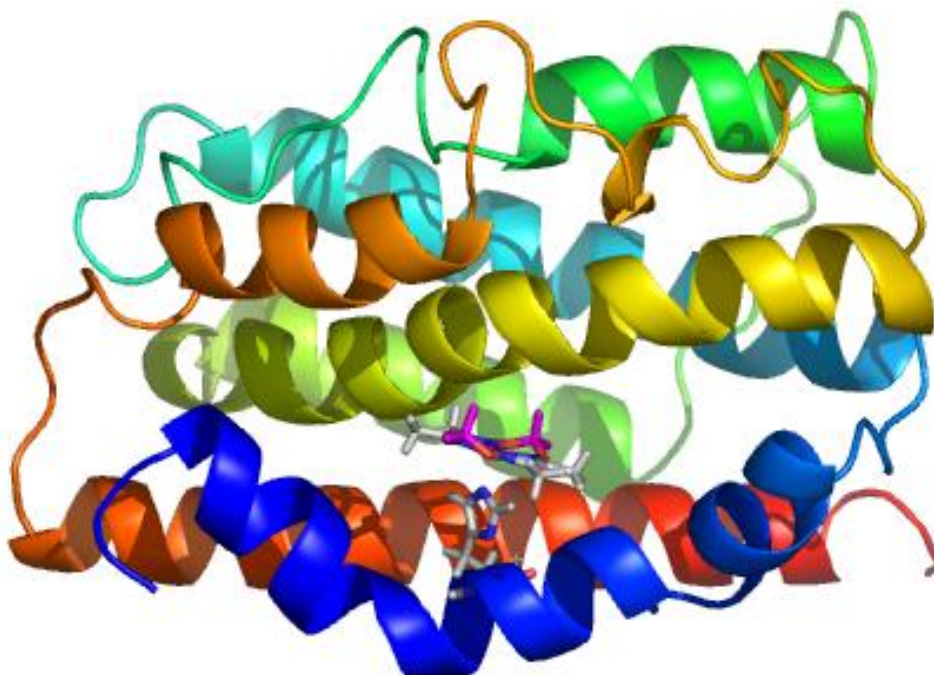


Représentation des structures secondaires des hybrides Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂] et HO1-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂].

Mb-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂]

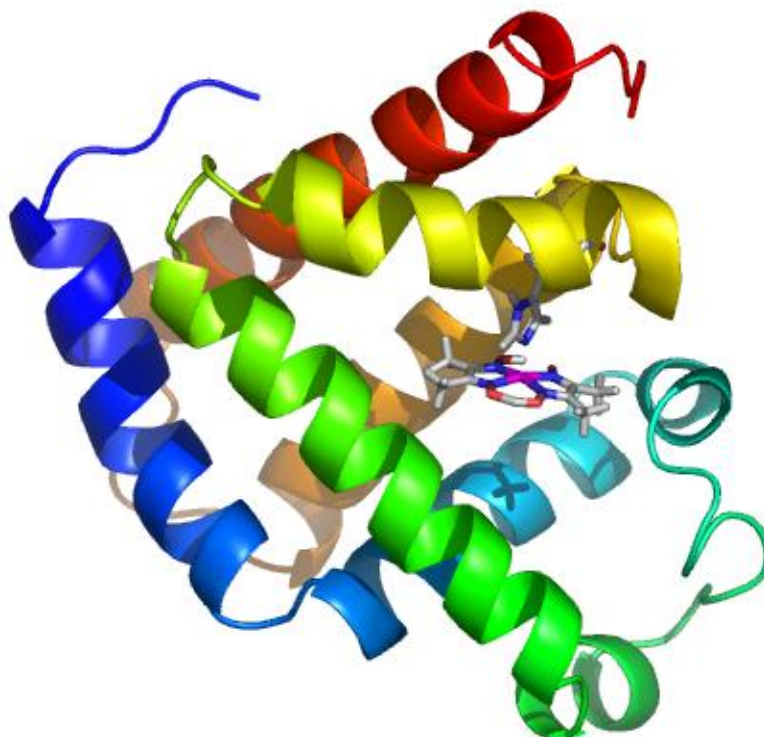


HO1-[Co(dmgbF₂)₂(H₂O)₂]

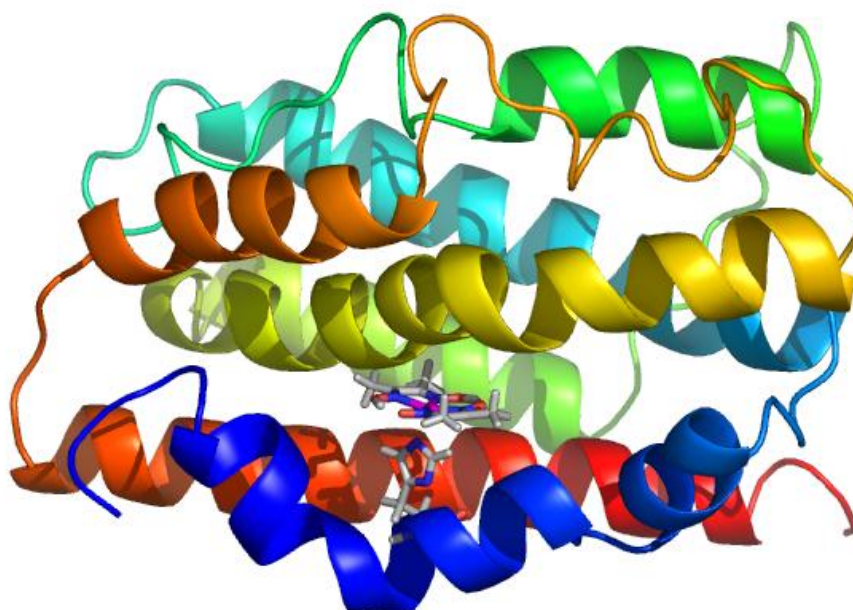


Représentation des structures secondaires des hybrides Mb-[Co(dmgh)₂(H₂O)₂] et HO1-[Co(dmgh)₂(H₂O)₂].

Mb-[Co(dmgh)₂(H₂O)₂]

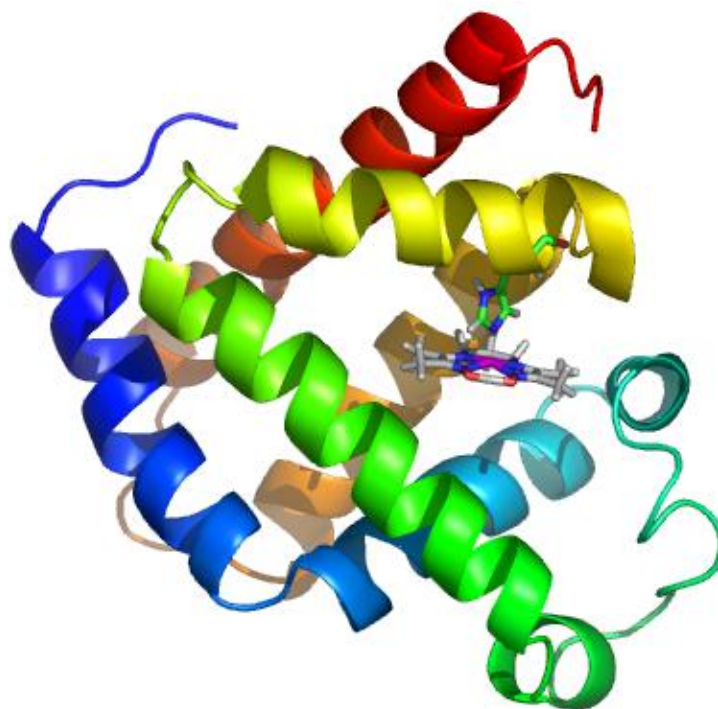


HO1-[Co(dmgh)₂(H₂O)₂]

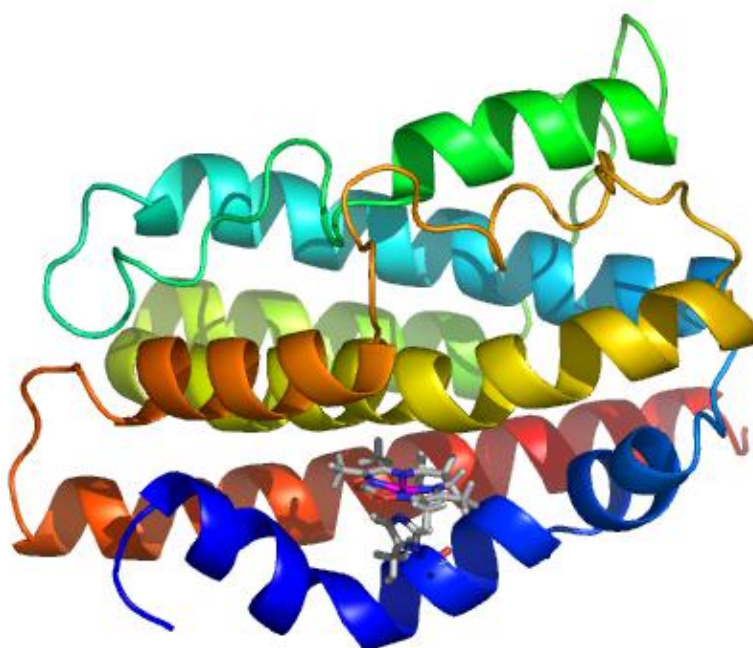


Représentation des structures secondaires des hybrides Mb-[Co(dmgh)₂(H₂O)₂] et HO1-[Co(dmgh)₂(H₂O)₂].

Mb-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂]



HO1-[Co{(DO)(DOH)pn}Cl₂]



REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- (1) Gordon, R. B.; Bertram, M.; Graedel, T. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 1209-1214.
- (2) Artero, V.; de Berardinis, V.; Ménage, S.; Weissenbach, J. *CLEFS CEA* **2013**, *61*, 78-80.
- (3) Stephenson, M.; Stickland, L. H. *The Biochemical journal* **1931**, *25*, 205-14.
- (4) Stephenson, M.; Stickland, L. H. *Biochemical Laboratory* **1930**, XXVII
- (5) Volbeda, A.; Charon, M. H.; Piras, C.; Hatchikian, E. C.; Frey, M.; Fontecillacamps, J. C. *Nature* **1995**, *373*, 580-587.
- (6) Peters, J. W.; Lanzilotta, W. N.; Lemon, B. J.; Seefeldt, L. C. *Science* **1998**, *282*, 1853-1858.
- (7) Jones, A. K.; Sillery, E.; Albracht, S. P. J.; Armstrong, F. A. *Chem. Commun.* **2002**, 866-867.
- (8) Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A. *Science* **1988**, *239*, 487-491.
- (9) Le Goff, A.; Artero, V.; Jousselme, B.; Tran, P. D.; Guillet, N.; Metaye, R.; Fihri, A.; Palacin, S.; Fontecave, M. *Science* **2009**, *326*, 1384-1387.
- (10) Razavet, M.; Artero, V.; Cavazza, C.; Oudart, Y.; Lebrun, C.; Fontecilla-Camps, J. C.; Fontecave, M. *Chem. Commun.* **2007**, 2805-2807.
- (11) Jacques, P. A.; Artero, V.; Pecaut, J.; Fontecave, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 20627-20632.
- (12) Baffert, C.; Artero, V.; Fontecave, M. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 1817-1824.
- (13) Razavet, M.; Artero, V.; Fontecave, M. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 4786-4795.
- (14) Kaserer, H. *Zentralbl. Bakteriол. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt.* **1906**, *2*, 681.
- (15) Adams, M. W. W.; Mortenson, L. E.; Chen, J. S. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *594*, 105-176.
- (16) INERIS *Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques* **2011**, Version N°2.4- septembre 2011.
- (17) Holm, R. H.; Kennepohl, P.; Solomon, E. I. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2239-2314.
- (18) Vignais, P. M.; Billoud, B.; Meyer, J. *FEMS Microbiol. Rev.* **2001**, *25*, 455-501.
- (19) Mertens, R.; Liese, A. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 343-348.
- (20) Kim, D. H.; Kim, M. S. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 8423-8431.
- (21) Berggren, G.; Adamska, A.; Lambert, C.; Simmons, T. R.; Esselborn, J.; Atta, M.; Gambarelli, S.; Mouesca, J. M.; Reijerse, E.; Lubitz, W.; Happe, T.; Artero, V.; Fontecave, M. *Nature* **2013**, *499*, 66-69.
- (22) Zirngibl, C.; Hedderich, R.; Thauer, R. K. *FEBS Lett.* **1990**, *261*, 112-116.
- (23) Heinekey, D. M. *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 2671-2680.
- (24) Buurman, G.; Shima, S.; Thauer, R. K. *FEBS Lett.* **2000**, *485*, 200-204.
- (25) Lyon, E. J.; Shima, S.; Buurman, G.; Chowdhuri, S.; Batschauer, A.; Steinbach, K.; Thauer, R. K. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 195-204.
- (26) Lyon, E. J.; Shima, S.; Boecher, R.; Thauer, R. K.; Grevels, F. W.; Bill, E.; Roseboom, W.; Albracht, S. P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14239-14248.
- (27) Shima, S.; Pilak, O.; Vogt, S.; Schick, M.; Stagni, M. S.; Meyer-Klaucke, W.; Warkentin, E.; Thauer, R. K.; Ermler, U. *Science* **2008**, *321*, 572-575.
- (28) Hiromoto, T.; Ataka, K.; Pilak, O.; Vogt, S.; Stagni, M. S.; Meyer-Klaucke, W.; Warkentin, E.; Thauer, R. K.; Shima, S.; Ermler, U. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 585-590.
- (29) Volbeda, A.; Garcin, E.; Piras, C.; deLacey, A. L.; Fernandez, V. M.; Hatchikian, E. C.; Frey, M.; FontecillaCamps, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12989-12996.
- (30) De lacey, A. L.; Fernandez, V. M.; Rousset, M.; Cammack, R. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4304-4330.
- (31) Montet, Y.; Amara, P.; Volbeda, A.; Vernede, X.; Hatchikian, E. C.; Field, M. J.; Frey, M.; FontecillaCamps, J. C. *Nature Structural Biology* **1997**, *4*, 523-526.
- (32) Fdez Galvan, I.; Volbeda, A.; Fontecilla-Camps, J. C.; Field, M. J. *Proteins* **2008**, *73*, 195-203.
- (33) Teixeira, V. H.; Soares, C. M.; Baptista, A. M. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **2008**, *70*, 1010-1022.
- (34) Rieder, R.; Cammack, R.; Hall, D. O. *Eur. J. Biochem.* **1984**, *145*, 637-643.

- (35) Teixeira, M.; Fauque, G.; Moura, I.; Lespinat, P. A.; Berlier, Y.; Prickril, B.; Peck, H. D.; Xavier, A. V.; Legall, J.; Moura, J. J. G. *Eur. J. Biochem.* **1987**, *167*, 47-58.
- (36) Teixeira, M.; Moura, I.; Fauque, G.; Czechowski, M.; Berlier, Y.; Lespinat, P. A.; Legall, J.; Xavier, A. V.; Moura, J. J. G. *Biochimie* **1986**, *68*, 75-84.
- (37) Garcin, E.; Vernede, X.; Hatchikian, E. C.; Volbeda, A.; Frey, M.; Fontecilla-Camps, J. C. *Struct. Fold. Des.* **1999**, *7*, 557-566.
- (38) Gutierrez-Sanchez, C.; Rudiger, O.; Fernandez, V. M.; De Lacey, A. L.; Marques, M.; Pereira, I. A. C. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15*, 1285-1292.
- (39) Fontecilla-Camps, J. C.; Volbeda, A.; Cavazza, C.; Nicolet, Y. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4273-4303.
- (40) McIntosh, C. L.; Germer, F.; Schulz, R.; Appel, J.; Jones, A. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11308-11319.
- (41) Fritsch, J.; Scheerer, P.; Frielingsdorf, S.; Kroschinsky, S.; Friedrich, B.; Lenz, O.; Spahn, C. M. T. *Nature*, **479**, 249-U134.
- (42) Pandelia, M.-E.; Nitschke, W.; Infossi, P.; Giudici-Ortoni, M.-T.; Bill, E.; Lubitz, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 6097-6102.
- (43) Shomura, Y.; Yoon, K. S.; Nishihara, H.; Higuchi, Y. *Nature*, **479**, 253-U143.
- (44) Lenz, O.; Ludwig, M.; Schubert, T.; Burstel, I.; Ganskow, S.; Goris, T.; Schwarze, A.; Friedrich, B. *ChemPhysChem*, *11*, 1107-1119.
- (45) Abou Hamdan, A.; Burlat, B.; Gutierrez-Sanz, O.; Liebgott, P.-P.; Baffert, C.; De Lacey, A. L.; Rousset, M.; Guigliarelli, B.; Leger, C.; Dementin, S. *Nature Chemical Biology* **2013**, *9*, 15-+.
- (46) Hemschemeier, A.; Melis, A.; Happe, T. *Photosynth. Res.* **2009**, *102*, 523-540.
- (47) Valente, F. M. A.; Oliveira, A. S. F.; Gnadt, N.; Pacheco, I.; Coelho, A. V.; Xavier, A. V.; Teixeira, M.; Soares, C. M.; Pereira, I. A. C. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10*, 667-682.
- (48) Hatchikian, E. C.; Forget, N.; Fernandez, V. M.; Williams, R.; Cammack, R. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *209*, 357-365.
- (49) Leger, C.; Elliott, S. J.; Hoke, K. R.; Jeuken, L. J. C.; Jones, A. K.; Armstrong, F. A. *Biochemistry* **2003**, *42*, 8653-8662.
- (50) Fourmond, V.; Baffert, C.; Sybirna, K.; Lautier, T.; Abou Hamdan, A.; Dementin, S.; Soucaille, P.; Meynial-Salles, I.; Bottin, H.; Leger, C. *J. Am. Chem. Soc.*, *135*, 3926-3938.
- (51) Willison, J. C.; Madern, D.; Vignais, P. M. *Biochem. J.* **1984**, *219*, 593-600.
- (52) Willison, J. C.; Vignais, P. M.; Magnin, J. P. *Int. J. Hydrogen Energy* **2006**, *31*, 1478-83.
- (53) Karyakin, A. A.; Morozov, S. V.; Karyakina, E. E.; Varfolomeyev, S. D.; Zorin, N. A.; Cosnier, S. *Electrochem. Commun.* **2002**, *4*, 417-420.
- (54) Hambourger, M.; Gervaldo, M.; Svedruzic, D.; King, P. W.; Gust, D.; Ghirardi, M.; Moore, A. L.; Moore, T. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2015-2022.
- (55) Ibers, J. A.; Holm, R. H. *Science* **1980**, *209*, 223-235.
- (56) Holm, R. H.; Solomon, E. I. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 347-348.
- (57) Reihlen, H.; Gruhl, A.; von Hessling, G. *Liebigs Ann. Chem.* **1929**, 472.
- (58) Seyferth, D.; Henderson, R. S.; Song, L. C. *Organometallics* **1982**, *1*, 125-133.
- (59) Schmidt, M.; Contakes, S. M.; Rauchfuss, T. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9736-9737.
- (60) Lyon, E. J.; Georgakaki, I. P.; Reibenspies, J. H.; Darensbourg, M. Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3178-3180.
- (61) Le Cloirec, A.; Best, S. P.; Borg, S.; Davies, S. C.; Evans, D. J.; Hughes, D. L.; Pickett, C. J. *Chem. Commun.* **1999**, 2285-2286.
- (62) Gloaguen, F.; Lawrence, J. D.; Rauchfuss, T. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9476-9477.
- (63) Ezzaher, S.; Gogoll, A.; Bruhn, C.; Ott, S. *Chem. Commun.*, *46*, 5775-5777.
- (64) Thomas, C. M.; Rudiger, O.; Liu, T.; Carson, C. E.; Hall, M. B.; Darensbourg, M. Y. *Organometallics* **2007**, *26*, 3976-3984.
- (65) Tard, C.; Liu, X. M.; Ibrahim, S. K.; Bruschi, M.; De Gioia, L.; Davies, S. C.; Yang, X.; Wang, L. S.; Sawers, G.; Pickett, C. J. *Nature* **2005**, *433*, 610-613.
- (66) Kramarz, K. W.; Norton, J. R. *Progress in Inorganic Chemistry, Vol 42* **1994**, *42*, 1-65.
- (67) Barton, B. E.; Rauchfuss, T. B. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 2261-2263.
- (68) Barton, B. E.; Olsen, M. T.; Rauchfuss, T. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16834-+.

- (69) Capon, J. F.; Gloaguen, F.; Schollhammer, P.; Talarmin, J. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 1664-1676.
- (70) Tard, C.; Pickett, C. J. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2245-2274.
- (71) Camara, J. M.; Rauchfuss, T. B. *Nature Chemistry* **2012**, *4*, 26-30.
- (72) Gimbert-Surinach, C.; Bhadbhade, M.; Colbran, S. B. *Organometallics* **2012**, *31*, 3480-3491.
- (73) Dey, S.; Rana, A.; Dey, S. G.; Dey, A. *Acs Catalysis*, *3*, 429-436.
- (74) Greco, C. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 1901-1908.
- (75) Canaguier, S.; Artero, V.; Fontecave, M. *Dalton Trans.* **2008**, 315-325.
- (76) Bouwman, E.; Reedijk, J. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 1555-1581.
- (77) Lai, C. H.; Reibenspies, J. H.; Darensbourg, M. Y. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2390-2393.
- (78) Stenson, P. A.; Marin-Becerra, A.; Wilson, C.; Blake, A. J.; McMaster, J.; Schroder, M. *Chem. Commun.* **2006**, 317-319.
- (79) Osterloh, F.; Saak, W.; Haase, D.; Pohl, S. *Chem. Commun.* **1997**, 979-980.
- (80) Davies, S. C.; Evans, D. J.; Hughes, D. L.; Longhurst, S.; Sanders, J. R. *Chem. Commun.* **1999**, 1935-1936.
- (81) Doukov, T. I.; Iverson, T. M.; Seravalli, J.; Ragsdale, S. W.; Drennan, C. L. *Science* **2002**, *298*, 567-572.
- (82) Zhu, W. F.; Marr, A. C.; Wang, Q.; Neese, F.; Spencer, D. J. E.; Blake, A. J.; Cooke, P. A.; Wilson, C.; Schroder, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 18280-18285.
- (83) Li, Z. L.; Ohki, Y.; Tatsumi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8950-8951.
- (84) Ogo, S.; Ichikawa, K.; Kishima, T.; Matsumoto, T.; Nakai, H.; Kusaka, K.; Ohhara, T. *Science* **2013**, *339*, 682-684.
- (85) Weber, K.; Kramer, T.; Shafaat, H. S.; Weyhermuller, T.; Bill, E.; van Gastel, M.; Neese, F.; Lubitz, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20745-20755.
- (86) Canaguier, S.; Field, M.; Oudart, Y.; Pecaut, J.; Fontecave, M.; Artero, V. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5876-5878.
- (87) Barton, B. E.; Rauchfuss, T. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14877-14885.
- (88) Barton, B. E.; Whaley, C. M.; Rauchfuss, T. B.; Gray, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6942-+.
- (89) Helm, M. L.; Stewart, M. P.; Bullock, R. M.; DuBois, M. R.; DuBois, D. L. *Science*, *333*, 863-866.
- (90) Kilgore, U. J.; Roberts, J. A. S.; Pool, D. H.; Appel, A. M.; Stewart, M. P.; DuBois, M. R.; Dougherty, W. G.; Kassel, W. S.; Bullock, R. M.; DuBois, D. L. *J. Am. Chem. Soc.*, *133*, 5861-5872.
- (91) DuBois, M. R.; DuBois, D. L. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 62-72.
- (92) Schrauze.Gn; Deutsch, E.; Windgass.Rj *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 2441-&.
- (93) Hussain Reddy, K. *Resonance* **1999**, *4*, 66-77.
- (94) Muller, O.; Muller, G. *Biochemische Zeitschrift* **1962**, *336*, 299-&.
- (95) Schrauze.Gn; Windgass.Rj; Kohnle, J. *Chem. Ber. Recl.* **1965**, *98*, 3324-&.
- (96) Artero, V.; Chavarot-Kerlidou, M.; Fontecave, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7238-7266.
- (97) Schrauze.Gn; Holland, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 1505-&.
- (98) Hawecker, J.; Lehn, J. M.; Ziessel, R. *Nouveau Journal De Chimie-New Journal of Chemistry* **1983**, *7*, 271-277.
- (99) Hu, X. L.; Cossairt, B. M.; Brunschwig, B. S.; Lewis, N. S.; Peters, J. C. *Chem. Commun.* **2005**, 4723-4725.
- (100) Solis, B. H.; Hammes-Schiffer, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19036-19039.
- (101) La constante de Hammet (pour une substitution en para) est une constante caractéristique d'un substituant en para de l'acide benzoïque en prenant en compte les effets inductif et mésomère.
- (102) Artero, V.; Fontecave, M. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 1518-1535.
- (103) Hu, X. L.; Brunschwig, B. S.; Peters, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8988-8998.
- (104) Solis, B. H.; Hammes-Schiffer, S. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 11252-11262.
- (105) Du, P. W.; Knowles, K.; Eisenberg, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12576-+.
- (106) Muckerman, J. T.; Fujita, E. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12456-12458.
- (107) Andreiadis, E. S.; Jacques, P. A.; Tran, P. D.; Leyris, A.; Chavarot-Kerlidou, M.; Jusselme, B.; Matheron, M.; Pecaut, J.; Palacin, S.; Fontecave, M.; Artero, V. *Nature Chemistry*, *5*, 48-53.

Références bibliographiques

- (108) Szajna-Fuller, E.; Bakac, A. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, 2488-2494.
- (109) Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Oxford University Press: New York* **1998**.
- (110) Breslow, R. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 146-153.
- (111) Molenveld, P.; Stikvoort, W. M. G.; Kooijman, H.; Spek, A. L.; Engbersen, J. F. J.; Reinhoudt, D. N. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3896-3906.
- (112) Bohmer, V. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 713-745.
- (113) Shinkai, S.; Yamashita, T.; Kusano, Y.; Manabe, O. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4947-4952.
- (114) Shinkai, S.; Kusano, Y.; Manabe, O.; Yoneda, F. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* **1980**, 1111-1115.
- (115) Murakami, Y.; Kikuchi, J.; Hisaeda, Y.; Hayashida, O. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 721-758.
- (116) Noren, C. J.; Anthonycahill, S. J.; Griffith, M. C.; Schultz, P. G. *Science* **1989**, *244*, 182-188.
- (117) Dutta, A.; Hamilton, G. A.; Hartnett, H. E.; Jones, A. K. *Inorg. Chem.*, *51*, 9580-9588.
- (118) Grzyb, J.; Xu, F.; Weiner, L.; Reijerse, E. J.; Lubitz, W.; Nanda, V.; Noy, D. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, *1797*, 406-413.
- (119) Roy, A.; Madden, C.; Ghirlanda, G. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 9816-9818.
- (120) Heinisch, T.; Ward, T. R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 184-199.
- (121) Pordea, A.; Creus, M.; Letondor, C.; Ivanova, A.; Ward, T. R. *Inorg. Chim. Acta* **2010**, *363*, 601-604.
- (122) Letondor, C.; Pordea, A.; Humbert, N.; Ivanova, A.; Mazurek, S.; Novic, M.; Ward, T. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8320-8328.
- (123) Letondor, C.; Humbert, N.; Ward, T. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 4683-4687.
- (124) Pordea, A.; Creus, M.; Letondor, C.; Ivanova, A.; Ward, T. R. *Inorg. Chim. Acta*, *363*, 601-604.
- (125) Lo, C.; Ringenberg, M. R.; Gndt, D.; Wilson, Y.; Ward, T. R. *Chem. Commun.*, *47*, 12065-12067.
- (126) Chevalley, A.; Salmain, M. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 11984-11986.
- (127) Cherrier, M. V.; Girgenti, E.; Amara, P.; Iannello, M.; Marchi-Delapierre, C.; Fontecilla-Camps, J. C.; Menage, S.; Cavazza, C. *J. Biol. Inorg. Chem.*, *17*, 817-829.
- (128) Komatsu, T.; Ishihara, S.; Tsuchida, E.; Nishide, H.; Morokuma, C.; Nakamura, S. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1489-1494.
- (129) Allard, M.; Dupont, C.; Robles, V. M.; Doucet, N.; Lledos, A.; Marechal, J. D.; Urvoas, A.; Mahy, J. P.; Ricoux, R. *ChemBioChem*, *13*, 240-251.
- (130) Ricoux, R.; Dubuc, R.; Dupont, C.; Marechal, J.-D.; Martin, A.; Sellier, M.; Mahy, J.-P. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 899-910.
- (131) Winter, M. B.; McLaurin, E. J.; Reece, S. Y.; Olea, C., Jr.; Nocera, D. G.; Marletta, M. A. *J. Am. Chem. Soc.*, *132*, 5582-+.
- (132) Woodward, J. J.; Martin, N. I.; Marletta, M. A. *Nature Methods* **2007**, *4*, 43-45.
- (133) Pinter, T. B. J.; Dodd, E. L.; Bohle, D. S.; Stillman, M. J. *Inorg. Chem.*, *51*, 3743-3753.
- (134) Ueno, T.; Koshiyama, T.; Abe, S.; Yokoi, N.; Ohashi, M.; Nakajima, H.; Watanabe, Y. *J. Organomet. Chem.* **2007**, *692*, 142-147.
- (135) Qi, D. F.; Tann, C. M.; Haring, D.; Distefano, M. D. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3081-3111.
- (136) Carey, J. R.; Ma, S. K.; Pfister, T. D.; Garner, D. K.; Kim, H. K.; Abramite, J. A.; Wang, Z. L.; Guo, Z. J.; Lu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10812-10813.
- (137) Haquette, P.; Salmain, M.; Svedlung, K.; Martel, A.; Rudolf, B.; Zakrzewski, J.; Cordier, S.; Roisnel, T.; Fosse, C.; Jaouen, G. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 224-231.
- (138) Haquette, P.; Jacques, J.; Dagorne, S.; Fosse, C.; Salmain, M. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 5087-5095.
- (139) Haquette, P.; Dumat, B.; Talbi, B.; Arbabi, S.; Renaud, J.-L.; Jaouen, G.; Salmain, M. *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 937-941.
- (140) Madern, N.; Talbi, B.; Salmain, M. *Appl. Organomet. Chem.*, *27*, 6-12.
- (141) Sano, Y.; Onoda, A.; Hayashi, T. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8229-8231.
- (142) Roy, S.; Shinde, S.; Hamilton, G. A.; Hartnett, H. E.; Jones, A. K. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2011**, 1050-1055.
- (143) Sano, Y.; Onoda, A.; Hayashi, T. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *108*, 159-162.
- (144) Kendrew, J. C.; Bodo, G.; Dintzis, H. M.; Parrish, R. G.; Wyckoff, H.; Phillips, D. C. *Nature* **1958**, *181*, 662-666.
- (145) Watanabe, Y.; Nakajima, H.; Ueno, T. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 554-562.

- (146) Wang, N. Y.; Zhao, X.; Lu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 16541-16547.
- (147) Sigman, J. A.; Kwok, B. C.; Lu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8192-8196.
- (148) Sato, H.; Watanabe, M.; Hisaeda, Y.; Hayashi, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 56-57.
- (149) Matsuo, T.; Dejima, H.; Hirota, S.; Murata, D.; Sato, H.; Ikegami, T.; Hori, H.; Hisaeda, Y.; Hayashi, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 16007-16017.
- (150) Sato, H.; Hayashi, T.; Ando, T.; Hisaeda, Y.; Ueno, T.; Watanabe, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 436-437.
- (151) Ohashi, M.; Koshiyama, T.; Ueno, T.; Yanase, M.; Fujii, H.; Watanabe, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 1005-+.
- (152) Abe, S.; Ueno, T.; Reddy, P. A. N.; Okazaki, S.; Hikage, T.; Suzuki, A.; Yamane, T.; Nakajima, H.; Watanabe, Y. *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 5137-5139.
- (153) Ascoli, F.; Fanelli, M. R.; Antonini, E. *Methods Enzymol.* **1981**, 76, 72-87.
- (154) Ueno, T.; Yokoi, N.; Unno, M.; Matsui, T.; Tokita, Y.; Yamada, M.; Ikeda-Saito, M.; Nakajima, H.; Watanabe, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 9416-9421.
- (155) Hughson, F. M.; Wright, P. E.; Baldwin, R. L. *Science* **1990**, 249, 1544-1548.
- (156) Barrick, D.; Baldwin, R. L. *Biochemistry* **1993**, 32, 3790-3796.
- (157) Jamin, M.; Baldwin, R. L. *J. Mol. Biol.* **1998**, 276, 491-504.
- (158) Eliezer, D.; Yao, J.; Dyson, H. J.; Wright, P. E. *Nature Structural Biology* **1998**, 5, 148-155.
- (159) Weisbuch, S. *Thèse* **2005**, 1.2 Le repliement de l'apomyoglobine de cachalot.
- (160) Hargrove, M. S.; Barrick, D.; Olson, J. S. *Biochemistry* **1996**, 35, 11293-11299.
- (161) Culbertson, D. S.; Olson, J. S. *Biochemistry* **2010**, 49, 6052-6063.
- (162) Omata, Y.; Asada, S.; Sakamoto, H.; Fukuyama, K.; Noguchi, M. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **1998**, 54, 1017-1019.
- (163) Hirotsu, S.; Chu, G. C.; Unno, M.; Lee, D. S.; Yoshida, T.; Park, S. Y.; Shiro, Y.; Ikeda-Saito, M. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279, 11937-11947.
- (164) Rodgers, K. R.; LukatRodgers, G. S.; Barron, J. A. *Biochemistry* **1996**, 35, 9539-9548.
- (165) Bouzhir, L. *Thèse* **2006**, 1.4.2. Le senseur à oxygène rhizobien FixL.
- (166) Perutz, M. F.; Paoli, M.; Lesk, A. M. *Chem. Biol.* **1999**, 6, R291-R297.
- (167) Springer, B. A.; Sligar, S. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 8961-8965.
- (168) Springer, B. A.; Egeberg, K. D.; Sligar, S. G.; Rohlf, R. J.; Mathews, A. J.; Olson, J. S. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 3057-3060.
- (169) Weisbuch, S.; Gerard, F.; Padeloup, M.; Cappadoro, J.; Dupont, Y.; Jamin, M. *Biochemistry* **2005**, 44, 7013-7023.
- (170) Du, J.; Sono, M.; Dawson, J. H. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, 255, 700-716.
- (171) Jennings, P. A.; Stone, M. J.; Wright, P. E. *J. Biomol. NMR* **1995**, 6, 271-276.
- (172) Ribeiro, E. A.; Ramos, C. H. I. *Anal. Biochem.* **2004**, 329, 300-306.
- (173) Urry, D. W. *J. Biol. Chem.* **1967**, 242, 4441-8.
- (174) Dartigalongue, T.; Niezborala, C.; Hache, F. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, 9, 1611-1615.
- (175) Sugishima, M.; Sakamoto, H.; Kakuta, Y.; Omata, Y.; Hayashi, S.; Noguchi, M.; Fukuyama, K. *Biochemistry* **2002**, 41, 7293-7300.
- (176) Schrauze, G.; Lee, L. P.; Sibert, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 2997-8.
- (177) www.uniprot.org.
- (178) Raffy, Q.; Ricoux, R.; Sansiaume, E.; Pethe, S.; Mahy, J. P. *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical* **2010**, 317, 19-26.
- (179) Bi, S. Y.; Ding, L.; Tian, Y.; Song, D. Q.; Zhou, X.; Liu, X.; Zhang, H. Q. *J. Mol. Struct.* **2004**, 703, 37-45.
- (180) Jaiswal, R.; Khan, M. A.; Musarrat, J. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **2002**, 67, 163-170.
- (181) Stan, D.; Matei, I.; Mihailescu, C.; Savin, M.; Matache, M.; Hillebrand, M.; Baci, I. *Molecules* **2009**, 14, 1614-1626.
- (182) Landfried, D. A.; Vuletich, D. A.; Pond, M. P.; Lecomte, J. T. J. *Gene* **2007**, 398, 12-28.
- (183) Koningsberger, D. C.; Mojet, B. L.; van Dorssen, G. E.; Ramaker, D. E. *Top. Catal.* **2000**, 10, 143-155.
- (184) Niklas, J.; Mardis, K. L.; Rakhimov, R. R.; Mulfort, K. L.; Tiede, D. M.; Poluektov, O. G. *J. Phys. Chem. B* **2012**, 116, 2943-2957.
- (185) mesuré par Oleg Poluektov du groupe de David Tiede de Argonne National Laboratory
- (186) Bakac, A.; Brynildson, M. E.; Espenson, J. H. *Inorg. Chem.* **1986**, 25, 4108-4114.
- (187) Schrauze, G.; Lee, L. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 1551-8.

Références bibliographiques

- (188) Jones, R. D.; Summerville, D. A.; Basolo, F. *Chem. Rev.* **1979**, 79, 139-179.
- (189) Lance, K. A.; Goldsby, K. A.; Busch, D. H. *Inorg. Chem.* **1990**, 29, 4537-4544.
- (190) Adin, A.; Espenson, J. H. *Inorg. Chem.* **1972**, 11, 686-688.
- (191) Corrêa, D. H. A.; Ramos, C. H. I. *African Journal of Biochemistry Research* **2009**, 3, 164-173.
- (192) Hwang, H. W.; Lee, J. R.; Chou, K. Y.; Suen, C. S.; Hwang, M. J.; Chen, C.; Shieh, R. C.; Chau, L. Y. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 22672-22679.
- (193) Uzawa, T.; Kimura, T.; Ishimori, K.; Morishima, I.; Matsui, T.; Ikeda-Saito, M.; Takahashi, S.; Akiyama, S.; Fujisawa, T. *J. Mol. Biol.* **2006**, 357, 997-1008.
- (194) Zahran, Z. N.; Chooback, L.; Copeland, D. M.; West, A. H.; Richter-Addo, G. B. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, 102, 216-233.
- (195) Hayashi, T.; Murata, D.; Makino, M.; Sugimoto, H.; Matsuo, T.; Sato, H.; Shiro, Y.; Hisaeda, Y. *Inorg. Chem.* **2006**, 45, 10530-10536.
- (196) Ueno, T.; Ohashi, M.; Kono, M.; Kondo, K.; Suzuki, A.; Yamane, T.; Watanabe, Y. *Inorg. Chem.* **2004**, 43, 2852-2858.
- (197) Sugishima, M.; Omata, Y.; Kakuta, Y.; Sakamoto, H.; Noguchi, M.; Fukuyama, K. *FEBS Lett.* **2000**, 471, 61-66.
- (198) Yang, X. Y.; Tian, G.; Jiang, N.; Su, B. L. *Energy Environ. Sci.* **2012**, 5, 5540-5563.
- (199) Pandelia, M.-E.; Fourmond, V.; Tron-Infossi, P.; Lojou, E.; Bertrand, P.; Leger, C.; Giudici-Orticoni, M.-T.; Lubitz, W. *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 6991-7004.
- (200) Taniguchi, I.; Sonoda, K.; Mie, Y. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, 468, 9-18.
- (201) Sun, W.; Li, X. Q.; Wang, Y.; Li, X.; Zhao, C. Z.; Jiao, K. *Bioelectrochemistry* **2009**, 75, 170-175.
- (202) Kumar, S. A.; Wang, S. F.; Chang, Y. T.; Lu, H. C.; Yeh, C. T. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2011**, 82, 526-531.
- (203) Mulfort, K. L.; Ponomarenko, N. S.; Bender, S. L.; Tiede, D. M. *Chem. Commun.* **2013**.
- (204) Toth, E.; Burai, L.; Merbach, A. E. *Coord. Chem. Rev.* **2001**, 216, 363-382.
- (205) Vincent, K. A.; Tilley, G. J.; Quammie, N. C.; Streeter, I.; Burgess, B. K.; Cheesman, M. R.; Armstrong, F. A. *Chem. Commun.* **2003**, 2590-2591.
- (206) Massey, V.; Hemmerich, P. *Biochemistry* **1978**, 17, 9-16.
- (207) Blankenhorn, G. *Eur. J. Biochem.* **1976**, 67, 67-80.
- (208) Hemmerich, P.; Massey, V.; Fenner, H. *FEBS Lett.* **1977**, 84, 5-21.
- (209) Duchstein, H. J.; Fenner, H.; Hemmerich, P.; Knappe, W. R. *Eur. J. Biochem.* **1979**, 95, 167-181.
- (210) Livingston, D. J.; Mclachlan, S. J.; Lamar, G. N.; Brown, W. D. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 5699-5707.
- (211) Hayashi, T.; Hitomi, Y.; Ogoshi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4910-4915.
- (212) Lubner, C. E.; Grimme, R.; Bryant, D. A.; Golbeck, J. H. *Biochemistry* **2010**, 49, 404-414.
- (213) Grimme, R. A.; Lubner, C. E.; Golbeck, J. H. *Dalton Trans.* **2009**, 10106-10113.
- (214) Grimme, R. A.; Lubner, C. E.; Bryant, D. A.; Golbeck, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 6308-+.
- (215) Schrauzer, G. N. *Inorg. Synth.* **1968**, 11.
- (216) Bakac, A.; Espenson, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 5197-5202.
- (217) Broomhead, J. A.; Young, C. G. *Inorg. Synth.* **1982**, 21, 127-128.
- (218) Janda, M.; Hemmerich, P. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1976**, 15, 443-444.
- (219) Elliott, J. I.; Brewer, J. M. *Arch. Biochem. Biophys.* **1978**, 190, 351-357.
- (220) Oreilly, J. E. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, 292, 509-515.